

Université de Sherbrooke

**Implication du facteur de transcription HNF4 α dans la régulation de
l'expression et la relâche de la chimiokine CXCL1 par les cellules
épithéliales intestinales lors d'un stress inflammatoire**

**Par Andrée-Anne Dupuis
Département d'anatomie et biologie cellulaire**

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc) en biologie cellulaire**

Le 6 ~~mai~~ 2010

**Pr Fernand-Pierre Gendron, département d'anatomie et biologie cellulaire
Pr Guillaume Grenier, département de chirurgie
Pr Abdelaziz Amrani, Département de pédiatrie - immunologie - allergologie**



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-65626-6
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-65626-6

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Table des matières

Table des matières	ii
Liste des illustrations.....	vi
Liste des sigles, abréviations et symboles.....	viii
Liste des communications	xi
Résumé	xiii
I. Introduction	1
1. Le système digestif.....	1
2. L'intestin grêle et l'axe crypte-villosité	1
3. L'épithélium colique	4
4. Rôle de barrière de l'épithélium intestinal	6
5. Réponse immunitaire intestinale	7
5.1. Participation des cellules épithéliales à la réponse immune	8
6. La chimiokine CXCL1	10
6.1. Régulation transcriptionnelle de CXCL1	11
7. Les maladies inflammatoires de l'intestin et le stress oxydatif.....	12
8. Le facteur de transcription HNF4 α	14
8.1. Structure	14
8.2. Isoformes	16
8.3. Co-facteurs de HNF4 α	16
8.4. La régulation de HNF4 α	17
8.5. Les fonctions de HNF4 α	19

8.5.1. Rôles au niveau du foie	19
8.5.2. Rôles au niveau de l'intestin	21
9. Hypothèse de recherche	23
II- Matériel et méthodes	25
1. Culture cellulaire	25
1.1. Cellules HEK 293T	25
1.2. Cellules Caco-2	25
1.3. Cellules Caco-2/shCtrl et Caco-2/shHNF4 α	26
1.4. Cellules IEC-6/RV, IEC-6/Cdx2 et IEC-6/Cdx2-HNF4 α	27
1.5. Cellules HT-29/RV et HT-29/HNF4 α	27
2. Production de virus	28
3. Infection lentivirale et rétrovirale	28
4. Traitement des cellules	29
4.1. Détermination de la concentration de H ₂ O ₂ et d'IL-1 β à utiliser	29
4.2. Traitement au (H ₂ O ₂) et à l' IL-1 β	29
4.3. Traitement des cellules avec des inhibiteurs de voies de signalisation	30
5. Analyse de l'expression ou des modifications des protéines cibles	30
5.1. Extraction des protéines totales	30
5.2. Extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques	31
5.3. Immunobuvardage de type Western	31
5.4. Micropuce d'anticorps	33
5.5. ELISA	33
6. Analyse de la liaison des facteurs de transcription à l'ADN	35

6.1. Hybridation des sondes et radiomarquage	35
6.2. Gel de rétention	36
7. Analyse de l'expression des gènes d'intérêt	37
7.1. Extraction de l'ARN total	37
7.2. Quantification de l'ARN total	38
7.3. Production d'ADN complémentaire.....	38
7.4. PCR quantitatif.....	39
8. Analyse de l'activation du promoteur d'intérêt par les facteurs de transcription par essai luciférase	40
8.1. Transformation bactérienne et extraction d'ADN plasmidique	40
8.2. Transfection transitoire	41
8.3. Lyse cellulaire et essai luciférase	42
9. Immunoprécipitation	42
 III- Résultats	
1. Des conditions pro-inflammatoires amènent une augmentation des niveaux protéiques et de l'activité de HNF4 α dans les cellules Caco-2	43
2. Criblage des facteurs inflammatoires produits au niveau des tissus coliques de souris de type sauvage et de souris invalidées pour le gène HNF4 α	47
3. Les tissus coliques de souris invalidées pour le gène <i>HNF4α</i> ont une expression accrue de KC/CXCL1	50
4. Validation de la surexpression de HNF4 α dans les cellules IEC-6, HT-29 et de la répression de l'expression de HNF4 α dans les cellules Caco-2	50

5. En conditions inflammatoires, la production de CXCL1 est diminuée dans les cellules exprimant le facteur de transcription HNF4α.....	53
6. Le transcrit de CXCL1 est diminué dans les cellules épithéliales surexprimant le facteur de transcription HNF4α.....	55
7. La présence de HNF4α réduit la capacité de NFκB d'activer le promoteur de <i>CXCL1</i>	58
8. Le facteur de transcription HNF4α ne lie pas le promoteur du gène <i>CXCL1</i> suite à la stimulation des cellules Caco-2 avec le H ₂ O ₂ (200 μM) et l'IL-1β (10ng/mL)	59
9. En conditions de stress inflammatoire, HNF4α n'interagit pas physiquement avec le facteur NFκB	61
10. La surexpression de HNF4α dans les cellules HT-29 entraîne une diminution de l'activation du facteur de transcription NFκB	63
11. L'inhibition de l'expression de HNF4α favorise l'activation de NFκB ainsi que sa liaison à l'ADN, attribuable à une diminution de la dégradation de IκBα	63
12. La phosphorylation de STAT3 est augmentée par la surexpression de HNF4α dans les cellules IEC-6	68
IV- Discussion.....	70
V- Conclusions et Perspectives	80
VI- Remerciements	83
VII- Bibliographie	85

Liste des illustrations

Figures

Figure 1 : <i>Structure de l'intestin grêle.</i>	2
Figure 2 : <i>Morphologie de l'épithélium colique.</i>	5
Figure 3 : <i>Cytokines et chimiokines sécrétées par l'épithélium intestinal.</i>	9
Figure 4 : <i>Domaines fonctionnels du facteur de transcription HNF4α.</i>	15
Figure 5 : <i>Des conditions de stress inflammatoire amènent une augmentation des niveaux protéiques de HNF4α et une augmentation de sa liaison à l'ADN</i>	44
Figure 6 : <i>L'augmentation protéique de HNF4α est dépendante de l'activité de la kinase de stress JNK en conditions de stress inflammatoire.</i>	45
Figure 7 : <i>L'inhibition du protéasome ne prévient pas la diminution des niveaux protéiques de HNF4α entraînée par l'inhibition de la kinase de stress JNK.</i>	46
Figure 8: <i>Les tissus coliques de souris invalidées pour le gène HNF4α ont une expression accrue de KC/CXCL1</i>	51
Figure 9: <i>Validation de la surexpression de HNF4α dans les cellules IEC-6 et HT-29 ainsi que de l'inhibition de l'expression de HNF4α dans les cellules Caco-2.</i>	52
Figure 10 : <i>En conditions inflammatoires, la production de CXCL1 est diminuée dans les cellules exprimant le facteur de transcription HNF4α.</i>	54
Figure 11 : <i>Le transcrit de CXCL1 est diminué dans les cellules épithéliales surexprimant le facteur de transcription HNF4α.</i>	56
Figure 12 : <i>La présence de HNF4α réduit la capacité de NFκB d'activer le promoteur de CXCL1.</i>	57

Figure 13 : <i>Le facteur de transcription HNF4α ne lie pas le promoteur du gène CXCL1 suite à la stimulation des cellules Caco-2 avec du H₂O₂ (200 μM) et IL-1β (10ng/mL).</i>	60
Figure 14 : <i>En conditions de stress inflammatoire, HNF4α n'interagit pas physiquement avec le facteur NFκB.</i>	62
Figure 15 : <i>La surexpression de HNF4α dans les cellules HT-29 entraîne une diminution de l'activation du facteur de transcription NFκB</i>	64
Figure 16 : <i>L'inhibition de l'expression de HNF4α favorise l'activation de NFκB ainsi que sa liaison à l'ADN</i>	66
Figure 17 : <i>La perte de HNF4α dans les cellules épithéliales intestinales amène une augmentation de la dégradation d'IκBa.</i>	67
Figure 18 : <i>La phosphorylation de STAT3 est augmentée par la surexpression de HNF4α dans les cellules IEC-6.</i>	69

Tableaux :

Tableau 1 : <i>Description des différents types cellulaires retrouvés au niveau de l'intestin grêle.</i>	3
Tableau 2. <i>Noms et séquences des shARN dirigés contre le transcrit de HNF4α.</i>	26
Tableau 3: <i>Description des anticorps utilisés pour l'immunodétection des protéines cibles.</i>	32
Tableau 4 : <i>Séquence des sondes utilisées pour réaliser les études de liaison des facteurs de transcription à l'ADN.</i>	36

Tableau 5: Séquences des amorces utilisées pour le PCR quantitatif.....	40
Tableau 6: La perte de HNF4α au niveau des tissus coliques de souris entraîne une production accrue de facteurs pro-inflammatoires.....	48

Liste des sigles, abréviations et symboles

α : Alpha

β : Bêta

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AMPK : Protéine kinase activée par l'AMP

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine 5'-Triphosphate

BSA : Albumine de sérum de bovin

Cdx2 : *Caudal type homeobox 2*

CEI : Cellules épithéliales intestinales

Ctrl : Contrôle

CXCL : *C-X-C motif chemokine*

DMEM : *Dulbecco's modified eagle's medium*

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

DR : *Direct repeat*

DSS : Sodium dextran sulfate

DTT : Dithiothrétiol

EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique

EGF : Facteur de croissance épidermique

FBS : Sérum bovin fœtal

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HNF : *Hepatocyte nuclear factor*

HRP : Peroxydase de raifort

IFN-γ : Interferon-gamma

IgA : Immunoglobulines A

IgG : Immunoglobulines G

IKK : Kinases de l'inhibiteur de kappa B

IκB : Inhibiteur de kappa B

IL : Interleukine

KEPI : Inhibiteur de la protéine phosphatase 1

LARII : Tampon substrat de la luciférase

JNK : Kinases N-terminal c-Jun

MAPK : Protéines Kinases activées par les mitogènes

MII: Maladies inflammatoires de l'intestin

NaF : Fluoride de sodium

NFκB : *Nuclear factor kappa B*

NP-40 : *Nonyl phenoxypolyethoxylethanol*

PARP-1 : Poly-ADP-ribose polymerase-1

PBS : Tampon phosphate

PCR : Réaction de polymérase en chaîne

PLB : Tampon de lyse passif

PMSF : Phénylméthylsulfonyl fluoride

PP1 : Protéine phosphatase 1

PP2A : Protéines phosphatase 2A

PVDF : Polyvinylidène difluoride

qPCR : PCR quantitatif en temps réel

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RV : Rétrovirus contenant la construction vide

SDS : Sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE : gel de polyacrylamide de 10 % contenant du SDS

Ser : Sérine

STAT : *Signal transducer and activator of transcription*

TNF α : *Tumor necrosis factor alpha*

TP : Température pièce

Liste des communications

Publications

1. Darsigny, M., Babeu, JP., **Dupuis, AA.**, Seidman EG, Lévy E, Verdu EF, Gendron FP, Boudreau F. (2009) Loss of hepatocyte-nuclear-factor-4 α reduces claudin-15 gene expression, impairs ion epithelial transport and leads to spontaneous inflammatory bowel disease in mice. PLoS One, 4(10):e7609.
2. Degagné E, Grbic DM, **Dupuis AA**, Lavoie EG, Langlois C, Jain N, Weisman GA, Sévigny J, Gendron FP. (2009) P2Y₂ receptor transcription is increased by NF-kappa B and stimulates cyclooxygenase-2 expression and PGE2 released by intestinal epithelial cells. J. Immunol, 183(7):4521-9.
3. Grbic DM, Degagné E, Langlois C, **Dupuis AA**, Gendron FP. (2008) Intestinal inflammation increases the expression of the P2Y₆ receptor on epithelial cells and the release of CXC chemokine ligand 8 by UDP. J. Immunol, 180 (4): 2659-68

Présentation orale

4. **Dupuis, AA.**, Gendron, FP. Le facteur de transcription HNF4 α : un gardien de l'homéostasie intestinale en conditions de stress inflammatoire. 50^{ème} réunion annuelle de Club de Recherche Clinique du Québec. 2-4 octobre 2008. Le Manoir Richelieu, Charlevoix, QC, Canada.

Présentations par affiches

5. Grbic, D., Degagné, E., Langlois, C., **Dupuis, A.A.** and Gendron F.P. P2Y₆ receptor stimulates CXCL8 secretion. Is there a link with intestinal inflammation?
Canadian Digestive Disease Week 2008, 29 février-3 mars, 2008. Montréal, QC, Canada.
6. Grbic, D., **Dupuis, A.A.**, and Gendron, F.P. L'activation du récepteur P2Y₂ des cellules épithéliales intestinale induit l'expression du TNF- α et du GM-CSF par un mécanisme dépendent des MAP kinases. 5^e Symposium de Physiopathologie Digestive, 15 et 16 juin 2006, Orford, QC. Canada.
7. Grbic, D., L'Ériger, K., **Dupuis, A.A.**, Beaulieu J.F., et Gendron, F.P. L'activation du récepteur P2Y₂ des cellules épithéliales intestinales induit l'expression du TNF-a et du GM-CSF par un mécanisme dépendant des MAP kinases. 48^{ième} réunion annuelle du CRCQ, 21-23 septembre 2006, Lac-à-l'Eau-Claire, QC, Canada.

Résumé

La participation de HNF4 α à la réponse inflammatoire se manifeste par différents rôles, notamment par la régulation transcriptionnelle du cytochrome P450, de l'oxyde nitrique synthase inductible, mais également par la protection face aux maladies inflammatoires de l'intestin (MII). En effet, la perte de HNF4 α au niveau de l'épithélium intestinal de souris rend celles-ci plus sensibles face à l'induction d'une colite chimique. Également, l'expression de HNF4 α est perdue au niveau des tissus coliques de patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin, dont la colite ulcéreuse. Les MII sont caractérisées par une activation chronique de la réponse immune et inflammatoire le long du tractus gastro-intestinal. L'agent causal est, dans la majorité des cas, la flore intestinale, laquelle peut activer plusieurs réponses inflammatoires, telle la sécrétion abondante de cytokines et d'interleukines pro-inflammatoires ainsi que le recrutement et l'infiltration de cellules immunitaires à l'épithélium, causant des dommages importants à la muqueuse intestinale et menant ainsi à une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal. La perte de HNF4 α au niveau de l'épithélium colique de souris a mené à l'apparition spontanée d'inflammation, à l'infiltration massive de cellules leucocytaires et a révélé une augmentation de la production de plusieurs facteurs pro-inflammatoires, dont la chimiokine KC/CXCL1. Cette molécule est en fait un chimioattractant important pour les neutrophiles et autres cellules leucocytaires.

Dans cette optique, nous avons évalué, par immunobuvardage et gel de rétention, l'impact d'un stress pro-inflammatoire sur l'expression et l'activité de

HNF4 α . Nous avons également déterminé l'effet de l'expression de HNF4 α sur la production de KC/CXCL1 ainsi que les mécanismes de régulation de HNF4 α sur l'expression de la chimiokine. Nous avons quantifié, par qPCR et par ELISA, la production et la sécrétion de KC/CXCL1 par les différentes lignées de cellules épithéliales intestinales surexprimant le facteur de transcription HNF4 α . Aussi, nous avons montré l'influence de HNF4 α sur l'activation de NF κ B, puisque ce facteur est responsable de la régulation transcriptionnelle de KC/CXCL1. Nous avons, en effet, montré que l'activation par phosphorylation, la translocation nucléaire et la capacité de liaison à l'ADN de NF κ B sont diminuées dans les modèles cellulaires de surexpression de HNF4 α . Nous avons finalement évalué l'effet de HNF4 α sur la dégradation de l'inhibiteur de kappaB (I κ B α). Dans cette étude, nous avons montré que le facteur de transcription HNF4 α régule de façon négative la production de la chimiokine KC/CXCL1 en modulant l'activité transcriptionnelle de NF κ B via la stabilisation de l'inhibiteur I κ B.

Mots-clés : Facteur de transcription, HNF4 α , NF κ B, chimiokine, CXCL1, stress inflammatoire, cellules épithéliales intestinales,

I- Introduction

1. Le système digestif

Le système digestif assure la transformation et l'absorption des aliments ingérés par l'organisme. Ce système est divisé en deux parties, le tube digestif qui s'étend de la bouche à l'anus et les annexes du tube digestif qui sont les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire, le pancréas et la rate. La transformation des aliments commence au niveau de l'estomac et se poursuit dans l'intestin grêle et le côlon. Tout au long du tractus gastro-intestinal, l'organisation structurale se caractérise par la présence d'une muqueuse, d'une sous-muqueuse, d'une musculuse et d'une séreuse.

2. L'intestin grêle et l'axe crypte-villosité

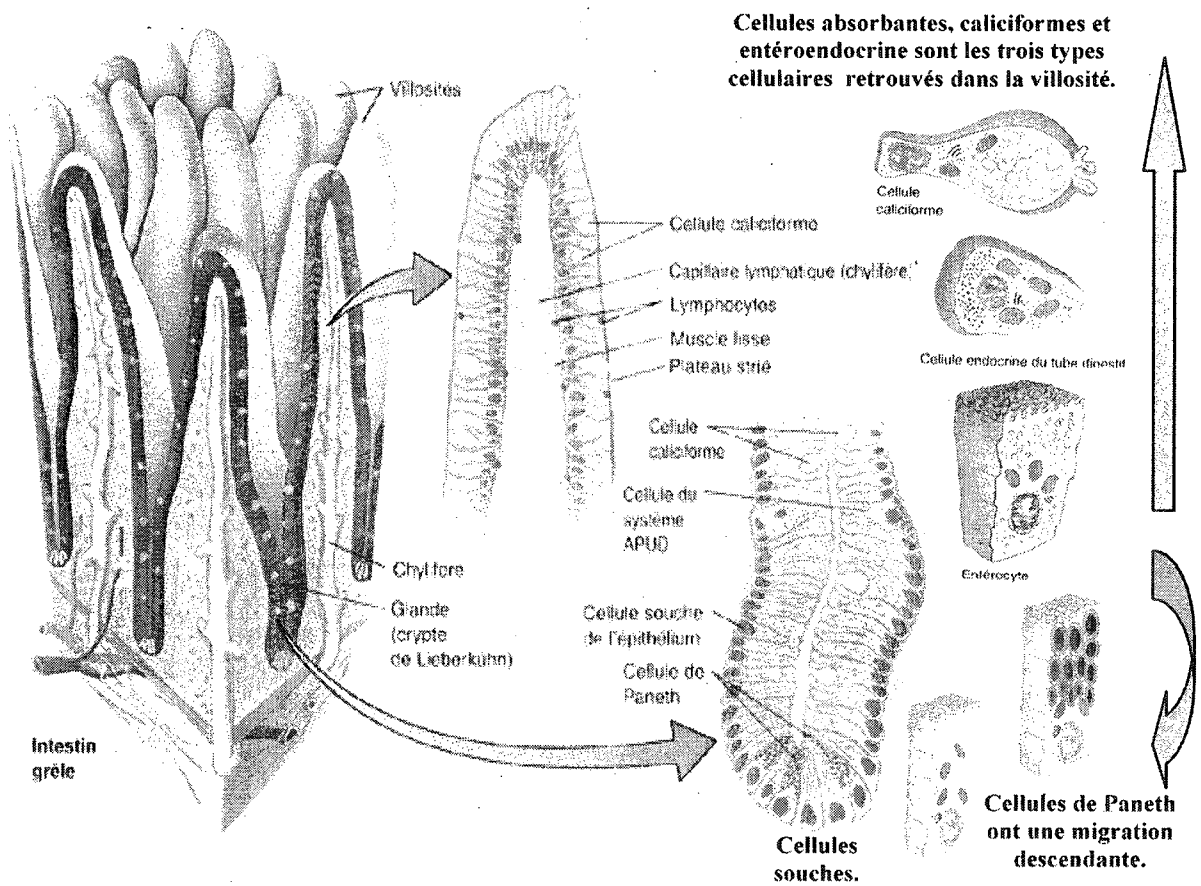
Les différents segments qui composent l'intestin grêle sont le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Gartner et Hiatt, 1997). La muqueuse de l'intestin grêle est responsable de la digestion fine et de l'assimilation des nutriments apportés par l'alimentation. De façon à accroître la surface de contact du bol alimentaire avec la muqueuse intestinale, celle-ci forme des replis circulaires appelés valvules conniventes, au niveau desquels on dénote la présence de projections en forme de doigts, les villosités, qui se prolongent sous forme de cryptes glandulaires.

L'axe crypte-villosité est divisé en deux parties, soit la crypte où l'on retrouve les cellules souches, les cellules prolifératives et les cellules de Paneth, et la villosité qui est composée des cellules entérocytaires, des cellules entéroendocrines et des

Figure 1 : Structure de l'intestin grêle.

L'unité fonctionnelle de l'intestin grêle est l'axe crypte-villosité. La crypte est composée de cellules souches, cellules prolifératives et des cellules de Paneth. Tandis que la villosité est composée des cellules entérocytaires, les cellules entéroendocrines et les cellules caliciformes. Les cellules souches de la base de la crypte vont donner naissance aux cellules prolifératives qui vont migrer jusqu'à la jonction crypte-villosité où elles entameront un processus de différenciation pour acquérir les caractéristiques propres aux différents types cellulaires retrouvés au niveau de l'épithélium intestinal.

Structure de l'intestin grêle : l'axe crypte-villosité



cellules caliciformes (Figure 1 adaptée de Gartner et Hiatt, 1997). Le renouvellement de l'épithélium digestif s'effectue aux 3 à 5 jours et est assuré par les cellules souches retrouvées au niveau de la crypte. Les cellules souches vont se diviser en cellules prolifératives qui vont migrer jusqu'à la jonction crypte-villosité où elles entameront un processus de différenciation pour donner naissance aux différents types cellulaires retrouvés au niveau de l'épithélium intestinal. On retrouve plusieurs types de cellules différenciées au niveau de l'intestin grêle, lesquels sont présentés dans le tableau 1. Le rôle fonctionnel de l'intestin grêle est assuré par les entérocytes, lesquels possèdent à leur surface plusieurs enzymes responsables de la digestion des sucres et protéines et divers transporteurs permettant l'absorption des nutriments, puis leur acheminement vers les systèmes sanguin et lymphatique.

Tableau 1 : Description des différents types cellulaires retrouvés au niveau de l'intestin grêle.

Type cellulaire	Localisation	Description
Cellules de Paneth	Compartiment cryptal, tout l'intestin grêle	Ont une migration descendante suite à leur différenciation. Caractérisées par de grosses granules de sécrétion contenant les lysozymes, les défensines, les cryptidines, phospholipase A ₂ . Sécrètent vers la lumière intestinale.
Cellules caliciformes	Villosités, plus abondantes dans la partie distale de l'intestin grêle	Impliquées dans la sécrétion de mucus vers la lumière intestinale formant une couche protectrice face aux stress physiques et pathogéniques.

Cellules entéroendocrines	Villosité, tout l'intestin grêle	Caractérisées par une multitude de granules de sécrétion correspondant à plusieurs hormones différentes, telles la sécrétine, sérotonine, gastrine, peptide inhibiteur gastrique. Sécrètent vers la circulation sanguine.
Cellules M	Associées aux plaques de Peyer, partie distale de l'iléon	Caractérisées par une multitude de petites vésicules. Cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes résidents de la muqueuse.
Cellules calvéolées, T	Tout l'intestin grêle	Peu abondantes. Caractérisées par de multiples vésicules et de longues microvillosités.
Entérocytes	Villosité, tout l'intestin grêle	Type cellulaire le plus abondant. Impliquées dans la digestion fine des nutriments, l'absorption et l'acheminement vers la circulation sanguine.

3. L'épithélium colique

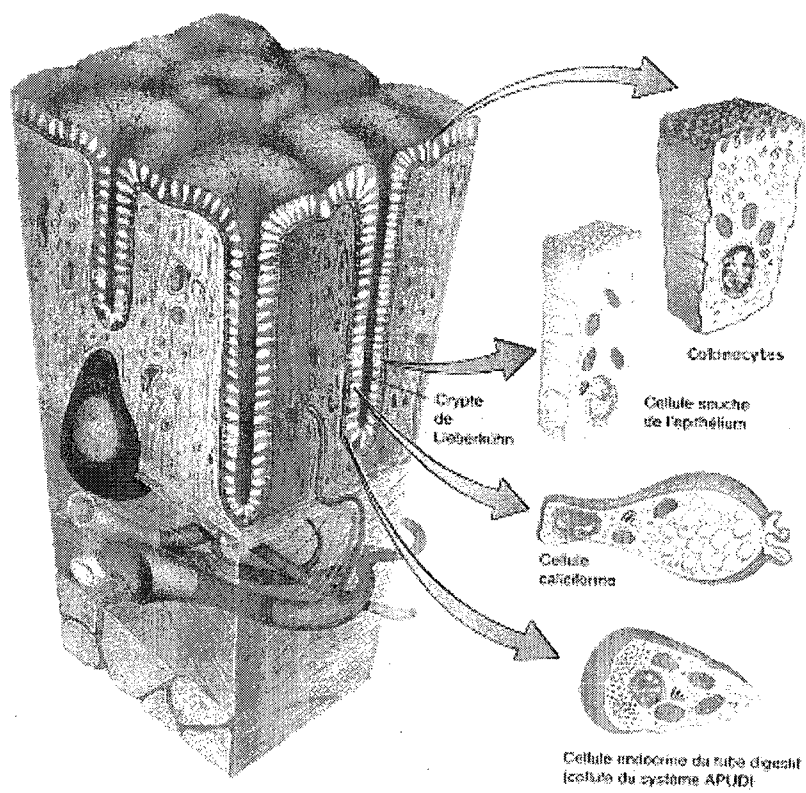
Le côlon est subdivisé en plusieurs segments, soient le cæcum, le côlon proximal, transverse, distal et se termine par le rectum et le canal anal (Gartner et Hiatt, 1997). Au niveau morphologique, le côlon est composé des cryptes de Lieberkühn qui s'enfoncent dans le chorion de la muqueuse (Gartner et Hiatt, 1997). Contrairement à l'intestin grêle, la présence de villosités n'est observable qu'aux stades embryonnaires antérieurs à la 30^{ème} semaine de développement, puisqu'il y a alors dégénérescence des villosités pour ne laisser que des cryptes dans le côlon adulte (Gartner et Hiatt, 1997).

L'épithélium colique est responsable de l'absorption des lipides, des sels et de l'eau de façon à concentrer les fèces. Cet épithélium de surface est composé

Figure 2 : Morphologie de l'épithélium colique

L'épithélium colique est formé de cryptes et d'un épithélium de surface. Au niveau des cryptes, les cellules souches vont donner naissance aux trois types de cellules différenciées, soient les colonocytes, les cellules caliciformes et les cellules entéroendocrines. Cependant, on note une différence majeure entre l'intestin grêle et le côlon, soit l'absence de cellules de Paneth au niveau de l'épithélium colique.

Morphologie de l'épithélium du côlon.



majoritairement de colonocytes, qui sont spécialisés dans l'absorption, mais on y retrouve également des cellules caliciformes et entéroendocrines, deux types de cellules sécrétrices (Karam 1999, Figure 2 adaptée de Gartner et Hiatt, 1997). Les cellules caliciformes, qui sont plus abondantes dans le côlon qu'au niveau de l'intestin grêle, sécrètent du mucus dans la lumière intestinale de façon à former une couche protectrice facilitant le passage du bol alimentaire. Les cellules entéroendocrines, quant à elles, ont pour rôle la sécrétion de diverses hormones au niveau de la lamina propria. Ces trois types cellulaires sont issus de la différenciation des cellules souches, lesquelles sont situées dans le fond des cryptes de Lieberkühn.

4. Rôle de barrière de l'épithélium intestinal

En plus de son implication dans la digestion et l'assimilation des nutriments, l'épithélium intestinal joue un rôle de barrière face aux différents pathogènes évoluant dans la lumière intestinale. En effet, la flore bactérienne du côlon compte jusqu'à 400 espèces de bactéries, lesquelles sont majoritairement commensales et exercent un rôle bénéfique pour l'organisme comme la digestion des acides gras et la production de vitamines utilisées par l'organisme (Muller *et al.*, 2005, Kelsall, 2008). Néanmoins, l'intrusion de ces bactéries ou d'agents pathogènes au niveau de la muqueuse intestinale entraîne inévitablement l'apparition de pathologies telles les maladies inflammatoires de l'intestin. À ce titre, l'épithélium intestinal exerce une fonction de barrière, d'abord, en formant un barrage physique étanche grâce aux jonctions serrées, mais aussi en sécrétant diverses molécules comme le mucus, les défensines, les

immunoglobulines A (IgA) ainsi que plusieurs protéines antimicrobiennes (Baumgart et Carding, 2007).

5. Réponse immunitaire intestinale

Bien que l'épithélium constitue une barrière capable de contrôler l'intrusion d'agents pathogènes, il arrive pourtant, dans certaines conditions, que l'intégrité de cette barrière se voie compromise, permettant ainsi l'invasion des couches sous-jacentes par les pathogènes. Dans ce cas, la réponse immunitaire joue un rôle clé dans l'établissement de défenses efficaces face aux agressions. Cette réponse immunitaire se doit d'être finement régulée de façon à éviter qu'une réponse démesurée ne s'établisse face à la microflore intestinale. À ce niveau, des mécanismes de tolérance sont mis en place face à la flore commensale de l'intestin. Ces mécanismes sollicitent l'implication des récepteurs de reconnaissance de motifs (Pattern recognition receptors, PRR) comme les récepteurs TLR (Toll-like receptors), LRR (récepteurs de séquences riches en leucine) et NOD (domaine d'oligomérisation des nucléotides) (MacDonald et Monteleone, 2005). En réponse à une blessure ou une agression, la première ligne de défense établie se fera par l'activation du système immunitaire inné. Ce mécanisme de défense est rapide et implique la participation de macrophages résidents de la muqueuse et de cellules dendritiques qui, une fois activés, vont relâcher plusieurs médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 β , le TNF- α , le CXCL8, l'IL-6 et l'IL-12, permettant ainsi le recrutement des monocytes et des neutrophiles circulants (Sandborn, 2004, Stadnyk, 2002).

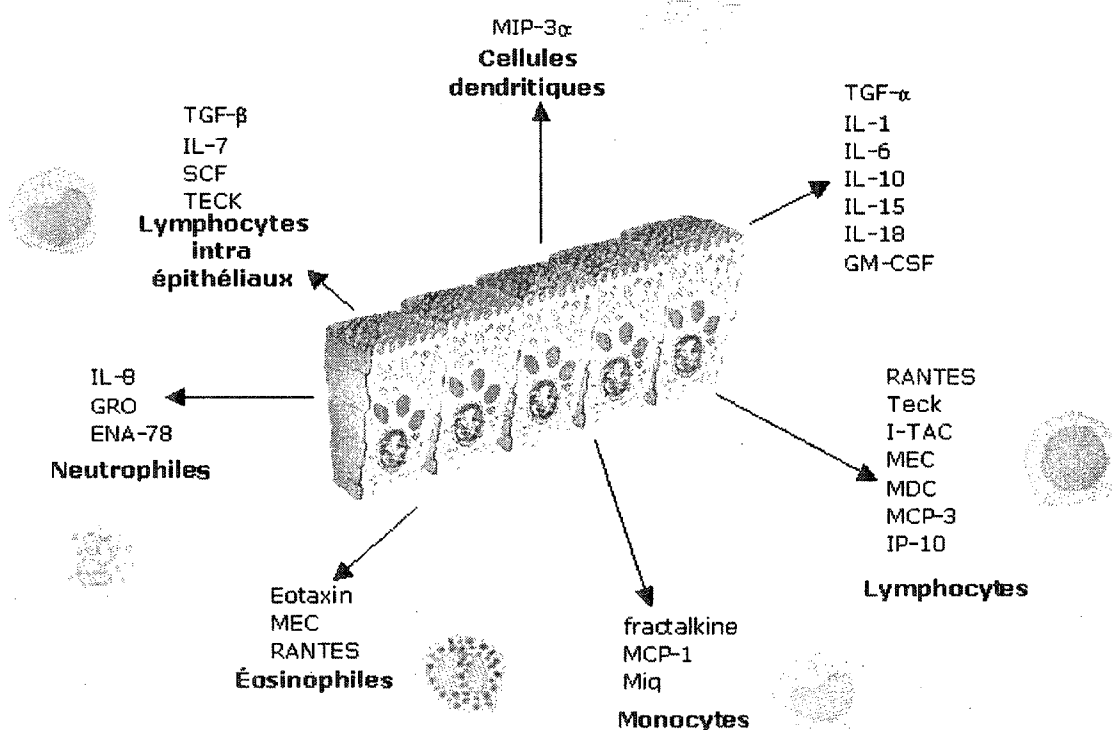
5.1. Participation des cellules épithéliales à la réponse immune

Les cellules épithéliales amènent également leur contribution dans la réponse immune face à l'attaque de pathogènes. L'épithélium intestinal sécrète et répond à une multitude de cytokines et chimiokines pro- et anti-inflammatoires (Figure 3 adaptée de Stadnyk, 2002). Il existe une interaction étroite et complexe entre la libération de ces médiateurs par les cellules épithéliales intestinales et la réponse des cellules immunitaires. En effet, certaines chimiokines comme le CXCL8, le CXCL1, le CXCL2 et le CXCL3, sont relâchées par les cellules épithéliales afin d'attirer les macrophages et les neutrophiles vers le site d'inflammation (Grbic *et al.*, 2008). Également, l'épithélium sécrète certains médiateurs chimioattractants, tels le CXCL10 et le CXCL11, qui sont impliqués dans la réponse immune acquise par le recrutement de sous-populations de lymphocytes T. De plus, les cellules épithéliales participent au maintien de l'équilibre et de l'intégrité de la muqueuse intestinale par le relâchement de plusieurs cytokines pro- et anti-inflammatoires. Par exemple, l'expression d'IL-1 β a été observée chez des rats en réponse à une infection par *Trichinella Spiralis* (Stadnyk et Kearsey, 1996) et suite à l'induction d'une colite à l'aide d'indométacine (Stadnyk, 2002). Aussi, il a été rapporté que les entérocytes de rats et de souris sécrètent de l'IL-1 β en réponse à l'induction d'une colite chimique (Radema *et al.*, 1991). De même, une relâche accrue d'IL-1 β a été rapportée chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (Radema *et al.*, 1991). D'une autre manière, la sécrétion d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, participe au maintien de l'équilibre de la réponse inflammatoire de la muqueuse intestinale par la suppression de l'activité de plusieurs cellules immunitaires (Al-Ashy *et al.*, 2006).

Figure 3 : Cytokines et chimiokines sécrétées par l'épithélium intestinal.

La figure regroupe les cytokines et chimiokines produites par les cellules épithéliales intestinales. Les principales cellules ciblées par ces cytokines et chimiokines sont montrées, toutefois, il faut noter qu'une molécule peut agir sur plus d'un type cellulaire. ENA (Epithelial-derive-neutrophil-activating peptide); IL (Interleukine); IP-10 (Interferon-inducible protein 10); I-TAC (Interferon-inducible T cell chemoattractant); GM-CSF (Granulocyte-macrophage-colony stimulin factor); GRO (Growth related oncogene); MDC (Macrophage derived chemokine); MEC (Mucosa-associated epithelial chemokine); Mig (Monokine induced by interferon- γ); MCP (Monocyte-Macrophage chemotactic peptide); RANTES (Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted); SCF (Stem cell factor); TECK (Thymus-expressed chemokine); TGF (Transforming growth factor). Figure adaptée de Stadnyk, 2002.

Cytokines et chimiokines sécrétées par l'épithélium intestinal.



Finalement, la réponse immunitaire des cellules épithéliales est un processus de communication complexe avec les cellules immunitaires et celui-ci se doit d'être finement régulé. En conditions normales, la cohabitation de l'hôte avec la flore intestinale commensale amène une réponse inflammatoire légère qui est tolérée par l'équilibre entre les signaux d'activation et d'inhibition du système immunitaire inné. Cependant, lorsque ces signaux d'inhibition sont déréglés, par exemple par des facteurs environnementaux ou des mutations génétiques, il survient une activation incontrôlée et exagérée de la réponse inflammatoire. Cela peut alors conduire vers un débalancement de l'immunité mucoale augmentant ainsi les risques d'inflammation chronique (Baumgart et Carding, 2007).

6. La chimiokine CXCL1

En réponse à un stimulus pro-inflammatoire, les cellules épithéliales intestinales vont produire et sécréter diverses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires ayant pour rôles de stimuler la migration des cellules immunitaires vers le site d'inflammation. Parmi cette multitude de facteurs, on retrouve la chimiokine CXCL1, aussi connue sous le nom de *growth-regulated oncogene alpha*, GRO α , laquelle fait partie de la sous-famille de chimiokines à motif CXC possédant un motif ELR (séquence glutamate-leucine-arginine) (Laing et Secombes, 2004). Cette classe de molécules lie le récepteur CXCR2, un récepteur couplé à une protéine G, retrouvé à la surface des neutrophiles, favorisant ainsi leur adhésion aux cellules endothéliales et subséquentement leur migration vers le site d'inflammation. En plus de son effet chimioattractant sur les neutrophiles, CXCL1 participe à la chimiotaxie et

l'activation des basophiles, des éosinophiles, des monocytes et des lymphocytes, lui conférant ainsi non seulement un rôle majeur dans la réponse inflammatoire primaire, mais aussi un rôle important dans l'inflammation chronique (Laing et Secombes, 2004). En plus de ses rôles dans l'inflammation, la surexpression de CXCL1 dans des mélanocytes immortalisés entraîne la transformation de ces cellules (Amiri *et al.*, 2006). Cet effet est en lien avec l'origine de CXCL1, qui a originalement été identifié comme facteur de croissance autocrine après avoir été purifié du surnageant d'une lignée cellulaire issue d'un mélanome humain, (Wang *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que CXCL1 agirait également comme médiateur capable de promouvoir l'angiogenèse dans le sarcome de Kaposi et certains cancers du poumon (Wang *et al.*, 2006).

6.1. Régulation transcriptionnelle de CXCL1

La régulation transcriptionnelle du gène *CXCL1* est assurée par un promoteur minimal de 306 paires de base où l'on retrouve un site de liaison pour le facteur de transcription *nuclear factor kappa B* (NFκB) (Nirodi *et al.*, 2001). Il a été rapporté que certains facteurs comme le TNFα, l'EGF et l'IL-1 stimulent l'expression de CXCL1 et que l'activation du promoteur de *CXCL1* fait intervenir les sous-unités p50 et p65/RelA du facteur NFκB (Feng *et al.*, 2006). Par exemple, la liaison de l'IL-1 à son récepteur mène à l'activation par phosphorylation du complexe de kinases de l'inhibiteur de kappa B (IKK) lesquelles phosphorylent subséquentment leur substrat, l'inhibiteur de kappa B (IκBα et β) entraînant sa dégradation par ubiquitination. En conditions basales, les protéines IκB séquestrent les sous-unités p50 et p65/RelA du

facteur de transcription NFκB, empêchant ainsi leur translocation nucléaire. Une fois les IκB dégradés, les deux sous-unités NFκB sont libres de transloquer au noyau pour y activer le promoteur du gène *CXCL1* (Nirodi *et al.*, 2001).

7. Les maladies inflammatoires de l'intestin et le stress oxydatif

Les maladies inflammatoires de l'intestin, telles la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn, sont caractérisées par une activation chronique de la réponse immune et inflammatoire le long du tractus gastro-intestinal. Dans le cas de ces deux maladies, un antigène peut activer plusieurs réponses inflammatoires, telles la sécrétion abondante de cytokines et d'interleukines pro-inflammatoires et le recrutement massif de cellules immunitaires à l'épithélium, causant des dommages importants à la muqueuse intestinale et menant ainsi à une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal (Festen *et al.*, 2009). Cependant, l'agent initiateur de ces maladies inflammatoires est encore aujourd'hui discuté. Généralement, l'hypothèse proposée suggère une dérégulation de l'immunité du tractus gastro-intestinal, puisque la maladie est souvent accompagnée d'une infiltration considérable de cellules immunitaires au niveau de la muqueuse intestinale. Toutefois, le stress oxydatif amène également une contribution importante aux maladies inflammatoires intestinales. De façon générale, les activités métaboliques cellulaires entraînent la formation de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont hautement réactives et dommageables pour la cellule (Rezaie *et al.*, 2007). Afin de maintenir l'équilibre redox et de contrôler les effets de ces réactifs, la cellule a développé divers mécanismes de détoxification

assurés par plusieurs enzymes, telles que la catalase et la glutathionne peroxydase qui vont catalyser le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène. Cependant, lorsque ces mécanismes sont insuffisants ou déficients, il y a accumulation de radicaux libres et de ROS provoquant inévitablement des dommages cellulaires comme l'oxydation de l'ADN, des protéines et la peroxydation des lipides membranaires. Ces dommages viennent ainsi perturber l'intégrité de la barrière épithéliale. Plusieurs études ont montré que les niveaux d'antioxydants et de molécules oxydées étaient anormaux chez des modèles animaux de maladies inflammatoires intestinales (Rezaie *et al.*, 2007, Tham *et al.*, 2002, Nieto *et al.*, 2002). Plus spécifiquement, une étude d'Esworthy et ses collaborateurs a montré qu'un modèle de souris invalidées pour les gènes *Gpx1* et *Gpx2*, codant pour une glutathionne peroxydase, développait une colite similaire à la colite ulcéreuse après seulement onze jours de vie (Esworthy *et al.*, 2001).

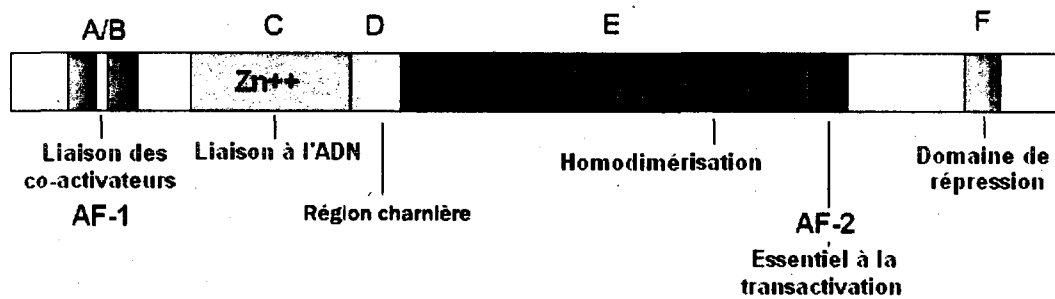
En bref, l'inflammation intestinale peut être causée par un influx de cellules immunitaires à la muqueuse intestinale provoquant des dommages à la barrière épithéliale intestinale, permettant l'infiltration des pathogènes au niveau de la lamina propria induisant ainsi une cascade destructive de réponses immunitaires et inflammatoires. Toutefois, le stress oxydatif apporte une contribution importante à ce phénomène majeur.

8. Le facteur de transcription HNF4 α

8.1. Structure

Le facteur nucléaire hépatique (HNF4) a originalement été identifié au niveau du foie et fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires orphelins (Sladek *et al.*, 1990). L'architecture de cette famille de récepteurs est caractérisée par la présence de six domaines conservés entre les différents membres (Figure 4). À l'extrémité N-terminale, se situe les domaines A/B, suivi du domaine C qui est responsable de la liaison à l'ADN assurée par les deux motifs en doigts de zinc. Le domaine D, quant à lui, constitue une région charnière flexible qui permet le changement de conformation lors de la dimérisation du récepteur. La dimérisation se fait au niveau du domaine E, région également impliquée dans la liaison du ligand (Hadzopoulou-Cladaras *et al.*, 1997, Ruse *et al.*, 2002, Ryffel, 2001). Bien que HNF4 soit considéré comme récepteur orphelin, certains acides gras, tels des acyles-CoA thioesters, ont été suggérés comme ligands potentiels (Hertz *et al.*, 1998, Petrescu *et al.*, 2002). En effet, la liaison directe de ces acyles-CoA thioesters entraînerait un changement dans la structure secondaire de HNF4 α . Cependant, il a été rapporté que la liaison de ces ligands n'était pas suffisante pour entraîner le changement de structure vers une conformation active (Duda *et al.*, 2004). Malgré tout, il semblerait qu'un acide gras endogène se lie de façon stable au domaine de liaison au ligand lors du repliement de la protéine, ce qui confère à HNF4 une activité transcriptionnelle constitutive (Wisely *et al.*, 2002). Cette activité est assurée par les deux régions de transactivation AF-1 et AF-2 qui sont situées respectivement dans les domaines A/B et E. Finalement, dans sa portion C-terminale, le facteur HNF4 possède le domaine F qui module l'interaction

Domaines fonctionnels du facteur de transcription HNF4 α



avec les cofacteurs, exerçant de cette façon un effet inhibiteur (Hadzopoulou-Cladaras *et al.*, 1997, Ruse *et al.*, 2002).

8.2. Isoformes

Le facteur HNF4 α se compose en fait de neuf isoformes (α 1- α 9) qui résultent de la présence et l'activation de deux promoteurs alternatifs (P1 et P2) et d'épissage alternatif. Les isoformes α 1 à α 6 qui sont issues du promoteur P1, montrent une activité transcriptionnelle plus forte due à la présence de la région AF-1, comparativement aux isoformes α 7 à α 9 qui sont tronquées au niveau de cette région. L'épissage alternatif permet de générer les différentes isoformes issues des deux promoteurs, lesquelles vont différer par leur domaine F et par des insertions d'acides aminés à leur extrémité N-terminale. Chacune des différentes formes de HNF4 α va reconnaître et lier la même séquence d'acides nucléiques, cependant, la localisation tissulaire et le pouvoir transcriptionnel vont varier entre les isoformes (Eeckhoutte *et al.*, 2003, Nakhei *et al.*, 1998, Torres-Padilla *et al.*, 2001).

8.3. Cofacteurs de HNF4 α

Bien que HNF4 α possède une activité transcriptionnelle constitutive, la régulation de l'expression de ces gènes cibles se fait via son interaction avec différents co-activateurs tels que PGC-1, SCR-3, GRIP-1, CBP/p300 et Cited2 ou avec le corépresseur SMRT (Louet *et al.*, 2002, Iordanidou *et al.*, 2005, Torres-Padilla *et al.*, 2002, Qu *et al.*, 2007). Les interactions avec ces cofacteurs se font au niveau des domaines de transactivation AF-1 et AF-2 ainsi qu'au niveau du domaine D. Le

domaine F, quant à lui, module l'affinité de la liaison des co-activateurs par le recrutement du corépresseur SMRT. La perte du domaine F résulte en une réduction marquée de la liaison de SMRT à HNF4 α (Ruse *et al.*, 2002). Étant donné les variations entre les différentes isoformes au niveau des domaines A/B et F, l'interaction des isoformes avec les divers cofacteurs vont varier, et du même coup, l'activité transcriptionnelle de chacune sera influencée.

La régulation spécifique des gènes cibles par HNF4 α dépend grandement des cofacteurs présents dans la cellule. En effet, l'interaction de HNF4 α avec le co-activateur PC4 a été démontrée pour être essentielle à la régulation positive de la transcription du gène *iNOS* (Guo *et al.*, 2007). Également, l'absence du co-activateur Cited2 entraîne une diminution de la liaison de HNF4 α au promoteur des gènes impliqués dans le développement fœtal du foie, causant une hypoplasie du foie, une désorganisation de l'architecture et un métabolisme déficient des lipides et du glucose chez les souris invalidées pour le gène *Cited2* (Qu *et al.*, 2007). Ainsi, la régulation fine des gènes cibles de HNF4 α se fait par les niveaux d'expression des isoformes de HNF4 α et de ses cofacteurs, mais aussi directement via la régulation du facteur de transcription lui-même.

8.4. La régulation de HNF4 α

L'activité du facteur de transcription HNF4 α est régulée par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels. Premièrement, la transcription du gène *HNF4 α* humain est assurée par deux mécanismes transcriptionnels alternatifs. En effet, l'activation du promoteur humain du gène *HNF4 α* est assurée par la synergie

entre les facteurs de transcription HNF1 α et HNF6 ainsi que HNF1 β et GATA6. De plus, le facteur COUP-TFII peut lier un élément de réponse DR1 localisé dans le promoteur de HNF4 α , agissant à ce niveau comme répresseur dans la régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires RXR α -RAR α (Hatzis et Talianidis, 2001). Également, l'activation de la cascade des MAPK entraîne une diminution de l'expression de HNF4 α dans une lignée cellulaire issue d'un hépatome humain via la perte de l'expression de C/EBP α . À ce niveau, les facteurs HNF1 α et HNF6 demeurent liés au promoteur tandis que la séquence *enhancer* se retrouve inoccupée favorisant une conformation linéaire du promoteur. La présence de C/EBP α engendrerait un changement tridimensionnel du promoteur permettant l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II (Hatzis *et al.*, 2006).

Le facteur de transcription HNF4 α subit également certaines modifications post-traductionnelles menant à la régulation de son pouvoir transcriptionnel. Premièrement, le cofacteur CBP acétyle HNF4 α sur des lysines au niveau du domaine de liaison à l'ADN, favorisant l'activité transcriptionnelle de HNF4 α par l'augmentation de son affinité pour l'ADN ainsi que pour CBP (Soutoglou *et al.*, 2000). Par le fait même, l'acétylation de HNF4 α est requise pour la rétention nucléaire du facteur de transcription en prévenant son exportation au cytoplasme via la protéine CRM1 (Soutoglou *et al.*, 2000). Deuxièmement, la phosphorylation de HNF4 α par la MAPK p38 rend celui-ci plus stable, augmentant ainsi ses niveaux protéiques nucléaires résultant en l'induction de l'expression de la 7 α -hydroxylase (Xu *et al.*, 2007). Dans certaines conditions, la phosphorylation de HNF4 α a plutôt pour effet de réduire son activité transcriptionnelle. En effet, il a été démontré que l'AMPK

phosphoryle directement HNF4 α au niveau du domaine E et que cette phosphorylation réduit sa capacité à dimériser et conséquemment à lier l'ADN (Hong *et al.*, 2003). Finalement, il a été rapporté que le suppresseur de tumeurs p53 exerce une répression sur le facteur de transcription HNF4 α en se liant à son domaine de liaison au ligand et que ce mécanisme impliquerait le recrutement d'histones désacétylases (Maeda *et al.*, 2002).

8.5. Les fonctions de HNF4 α

Le facteur de transcription HNF4 a originalement été isolé du foie de rat (Costa, *et al.*, 1989). Des études chez la drosophile et chez *Xenopus* suggèrent que HNF4 joue un rôle dans le développement embryonnaire précoce (Ryffel, 2001). Son importance au niveau de l'embryogenèse a également été rapportée chez les mammifères, via un modèle de souris invalidée pour le gène *HNF4*, lequel est incapable de compléter la gastrulation (Chen *et al.*, 1994) en raison d'une mort cellulaire au niveau de l'ectoderme au jour embryonnaire 6,5. Aussi, HNF4 α a été décrit comme ayant des rôles dans plusieurs processus biologiques importants, telles la différenciation et les fonctions métaboliques. Bien que HNF4 α soit retrouvé au niveau du foie, des reins, de l'intestin, du pancréas et de l'estomac, dans cet ouvrage, seuls ses rôles au niveau du foie et de l'intestin seront abordés.

8.5.1. Rôles au niveau du foie

HNF4 α est considéré comme un facteur de transcription prédominant au niveau du foie, en raison de ses rôles dans la régulation d'un grand nombre de gènes

impliqués dans la différenciation terminale des hépatocytes. En effet, l'équipe de Duncan et ses collaborateurs a montré que l'expression de HNF4 α dans l'endoderme viscéral est nécessaire pour la survie de l'ectoderme embryonnaire et la gastrulation chez la souris (Duncan *et al.*, 1997). Dans cette étude, la létalité embryonnaire associée à l'inactivation du gène pouvait être évitée par la complémentation tétraploïde, technique visant à remplacer l'endoderme invalidé par des tissus extra-embryonnaires exprimant toujours HNF4 α , permettant de dépasser le septième jour embryonnaire (Duncan *et al.*, 1997). Chez ces embryons, la spécification et le développement du foie ont lieu, cependant, les hépatocytes sont incapables d'exprimer plusieurs gènes essentiels aux fonctions hépatiques, montrant ainsi l'importance de HNF4 α dans la différenciation terminale des hépatocytes (Li *et al.*, 2000). Néanmoins, les embryons réchappés ne survivent pas au-delà du douzième jour embryonnaire et donc ce modèle ne permet pas d'évaluer l'impact de la perte de HNF4 α plus tard dans le développement. Pour contrer ce problème, un modèle murin de délétion conditionnelle a été généré en utilisant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de l'albumine. Cependant, le modèle généré par Parviz et ses collaborateurs ne survit pas au-delà du jour E18,5 en raison de défauts majeurs au foie (Parviz *et al.*, 2003). En effet, le foie de ces souris montre des lésions importantes ainsi qu'une perte de cohésion du tissu. De plus, la différenciation hépatocytaire est incomplète et la perte d'expression de plusieurs molécules de jonctions empêche l'organisation en épithélium (Parviz *et al.*, 2003). Pourtant, dans les cas où la perte de HNF4 α survient au stade post-natal, observable chez le modèle H4LivKO généré par Hayhurst et ses collaborateurs, aucun défaut morphologique majeur n'est apparent,

seule la dérégulation du métabolisme lipidique est conséquente à la délétion (Hayhurst *et al.*, 2001). Ainsi, HNF4 α est essentiel à la différenciation terminale des hépatocytes, à l'établissement d'un épithélium hépatique, mais est aussi requis pour le maintien des fonctions métaboliques hépatiques.

Les fonctions de HNF4 α au niveau de la différenciation et du métabolisme des hépatocytes ont également été rapportées au niveau cellulaire. En effet, les cellules H33, issues d'un carcinome hépatique murin généré par l'utilisation de diéthylnitrosamine et de phénobarbital, montrent une perte de HNF4 α et du même coup une perte d'expression de gènes impliqués dans les fonctions d'hépatocytes matures, en plus d'être complètement dédifférenciées (Lazarevich *et al.*, 2004). L'expression forcée de HNF4 α au niveau de ces cellules rétablit l'expression de plusieurs gènes hépatiques tels *α 1-antitrypsine*, *Apo-A1*, *Apo-A4* ainsi que de certains facteurs de transcription régulant les fonctions hépatiques, tels que HNF1 α et HNF6 (Lazarevich *et al.*, 2004). De plus, la réintroduction de HNF4 α amène les cellules à adopter une morphologie épithéliale, puisqu'il y a induction de l'expression de protéines de jonctions, comme ZO-1, montrant que les cellules sont capables de former des jonctions serrées (Lazarevich *et al.*, 2004). Encore une fois, ces résultats ont permis de constater l'importance de HNF4 α comme un régulateur important de la différenciation hépatique.

8.5.2. Rôles au niveau de l'intestin

Le facteur de transcription HNF4 α joue également un rôle dans le développement du système digestif. Ce rôle a été démontré par l'utilisation d'un

modèle murin de délétion conditionnelle du gène *HNF4α* par la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur *Foxa3* (Garrison *et al.*, 2006). Dans cette étude, il a été montré que HNF4α est essentiel au développement normal du côlon (Garrison *et al.*, 2006). En effet, les embryons invalidés montrent des défauts au niveau de l'épithélium colique en plus de présenter une absence totale de cryptes, une diminution de la prolifération des cellules épithéliales, un blocage de la maturation des cellules caliciformes, un élargissement de la lumière intestinale et une perte d'expression de plusieurs gènes contrôlant les fonctions normales du côlon (Garrison *et al.*, 2006). Néanmoins, malgré la perte de HNF4α, plusieurs aspects du développement précoce du côlon ont lieu normalement, telle la spécification de tous les types cellulaires et la conversion de l'épithélium pseudostratifié en épithélium simple prismatique (Garrison *et al.*, 2006). Ces observations suggèrent que HNF4α est requis pour le maintien de l'expression de gènes contribuant aux fonctions et à la différenciation terminale de l'épithélium colique.

Aussi, la génération d'un modèle murin de délétion conditionnelle du gène *HNF4α* utilisant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de la villine, a permis de mettre en lumière l'importance de HNF4α dans le maintien de l'homéostasie intestinale et de montrer le rôle de HNF4α dans la régulation de l'expression de la claudine-15, protéine présente au niveau des jonctions serrées (Darsigny *et al.*, 2009). En effet, Darsigny et ses collaborateurs ont montré que les souris invalidées exposent un phénotype inflammatoire spontané s'apparentant à la colite ulcéreuse, soit une désorganisation des cryptes dès l'âge de trois mois, une augmentation de l'infiltration de cellules leucocytaires et un allongement des cryptes.

Dans cette étude, les auteurs ont également rapporté leurs résultats au niveau de modèles de maladies inflammatoires de l'intestin observés chez l'humain, en montrant que l'ARNm de HNF4 α était significativement diminué au niveau de biopsies intestinales chez des patients atteints de la maladie de Crohn et de colite ulcéreuse.

Au niveau de l'intestin grêle, des études ont montré la participation de HNF4 α dans la différenciation entérocytaire. En effet, une étude de Stegmann et ses collaborateurs a montré qu'il y a un marquage plus important de HNF4 au niveau de la villosité (Stegmann *et al.*, 2006). Cette même étude a révélé, par analyse d'immunoprécipitation de la chromatine, la présence de HNF4 au niveau du promoteur de plusieurs gènes spécifiques aux fonctions entérocytaires, tels que les gènes de l'apolipoprotéine A4 et de l'aminopeptidase N (Stegmann *et al.*, 2006). Précédemment, HNF4 α avait été rapporté pour lier et activer le promoteur du gène de la phosphatase alcaline, et ce, d'une manière dépendante de la différenciation (Olsen *et al.*, 2005).

9. Hypothèse de recherche

L'importance de HNF4 α au niveau de nombreux processus biologiques a été bien démontrée. En effet, la perte de ce facteur de transcription au niveau des différents stades du développement résulte en une multitude de défauts allant d'une incapacité à compléter la gastrulation, jusqu'à la perte d'expression des gènes des fonctions hépatiques et intestinales. La perte de HNF4 α au niveau du côlon, à un stade post-natal, engendre un phénotype inflammatoire. Également, il a été rapporté que l'expression du facteur de transcription HNF4 α est diminuée au niveau du côlon des

patients atteints de colite ulcéreuse (Darsigny *et al.*, 2009). Au niveau cellulaire, l'équipe de Guo a démontré que l'activité de HNF4 α est augmentée suite à un stress inflammatoire et qu'en réponse à ce stimulus, HNF4 α régule positivement la transcription du gène de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) (Guo *et al.*, 2006).

À la lumière de tous ces résultats, nous avons posé l'hypothèse selon laquelle le facteur de transcription HNF4 α protège les cellules épithéliales intestinales face à un stress inflammatoire en régulant négativement l'expression de CXCL1.

Pour répondre à cette hypothèse, nous avons établi trois objectifs de recherche, soient :

- 1) Évaluer l'impact d'un stress pro-inflammatoire sur l'expression et l'activité transcriptionnelle de HNF4 α ;
- 2) Déterminer les voies de signalisation activées par un stress pro-inflammatoire et impliquées dans la régulation de l'expression et de l'activité de HNF4 α ;
- 3) Caractériser les mécanismes de régulation de HNF4 α sur la production de la cytokine pro-inflammatoire CXCL1 par les cellules épithéliales intestinales.

II- Matériel et Méthodes

1. Culture cellulaire

1.1. Cellules HEK 293T

La lignée cellulaire HEK 293T (ATCC, CRL-11268) est une lignée fœtale humaine transformée de reins. Ces cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (Wisent, St-Bruno, Québec) en présence de 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (Wisent, St-Bruno, Québec), 2 mM de glutamine (GlutaMax, Invitrogen Burlington, Ontario, Canada), 0,01M d'HEPES (Wisent, St-Bruno, Québec) et 100 µg/mL de pénicilline/streptomycine (Wisent, St-Bruno, Québec), à 37 °C dans une atmosphère de 95% air et 5% CO₂. Le milieu a été changé aux 2 jours et les cellules ont été réensemencées dans un ratio 1:10 à l'atteinte de la confluence.

1.2. Cellules Caco-2

La lignée cellulaire Caco-2 (ATCC, HTB-37) cancéreuse provient d'un adénocarcinome de côlon humain. Ces cellules ont la particularité d'entamer un processus de différenciation à l'atteinte de la confluence, donnant ainsi naissance à des cellules différenciées qui ont une morphologie similaire à celle des entérocytes (Jumarie et Malo, 1991). Ces cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (Wisent, St-Bruno, Québec) en présence de 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (Wisent, St-Bruno, Québec), 2 mM de glutamine (GlutaMax, Invitrogen Burlington, Ontario, Canada), 0,01M d'HEPES (Wisent, St-Bruno, Québec) et 100 µg/mL de pénicilline/streptomycine (Wisent, St-Bruno, Québec), à 37 °C dans une atmosphère

de 95% air et 5% CO₂. Le milieu a été changé aux 2 jours et les cellules ont été réensemencées dans un ratio 1:5 lorsque les cellules atteignaient 70% à 80% de confluence.

1.3. Cellules Caco-2/shCtrl et Caco-2/shHNF4 α

Les cellules Caco-2/shCtrl et Caco-2/shHNF4 α ont été générées par infection lentivirale de la lignée cellulaire Caco-2 avec la construction pLKO.1-puro contenant un shARN dirigé contre l'ARN messager de HNF4 α (Mission shRNA, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) ou ne ciblant aucune protéine humaine. Les séquences d'ARN messagers ciblés sont présentées dans le tableau 2. Les cellules ont été sélectionnées et cultivées dans du milieu DMEM (Wisent, St-Bruno, Québec) contenant 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (Wisent, St-Bruno, Québec), 2 mM de glutamine (GlutaMax, Invitrogen Burlington, Ontario, Canada), 10mM d'HEPES (Wisent, St-Bruno, Québec) et 7,5 μ g/mL de puromycine (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), à 37 °C dans une atmosphère humide (5% CO₂ et 95% air). Le milieu a été changé aux 2 jours et les cellules ont été réensemencées dans un ratio 1:5 lorsque les cellules atteignaient 70-80% de confluence.

Tableau 2. Noms et séquences des shARN dirigés contre le transcrit de HNF4 α .

Nom	Séquence (5'-3') (Nucléotides)	Numéro de référence (Sigma-Aldrich)
shHNF4 α -89	CCACATGTACTCCTGCAGATT (362-382)	TRCN0000019189
shHNF4 α -90	GCAGGAACATATGGGAACCAA (1271-1291)	TRCN0000019190

1.4. Cellules IEC-6/RV, IEC-6/Cdx2 et IEC-6/Cdx2-HNF4 α

Les cellules IEC-6/RV, IEC-6/Cdx2 et IEC-6/Cdx2-HNF4 α sont issus de la lignée de cellules épithéliales intestinales normales de rat IEC-6 (ATCC, CRL-1592) (Quaroni et May, 1980). Ces trois lignées cellulaires ont été générées par infection rétrovirale à l'aide du vecteur pBabe-puro vide (RV) et des constructions pBabe-puro/Cdx2 (humain) et pBabe-puro/HNF4 α (humain), réalisée par l'équipe du Professeur François Boudreau (Lussier *et al.*, 2008). Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (Wisent, St-Bruno, Québec) contenant 5% de sérum fœtal bovin (FBS) (Wisent, St-Bruno, Québec), 25 mM d'HEPES (Wisent, St-Bruno, Québec) et 0,1 U/L d'insuline. Les cellules ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humide composée à 95% d'air et 5% de CO₂, le milieu cellulaire a été remplacé aux 2 jours et le réensemencement cellulaire s'est fait dans un ratio 1:6 à l'atteinte de la confluence.

1.5. Cellules HT-29/RV et HT-29/HNF4 α

Les cellules HT-29/RV et HT-29/HNF4 α ont été générées par infection rétrovirale de la lignée cellulaire HT-29 (ATCC, HTB-38), issue d'un adénocarcinome de côlon humain. Ces deux lignées cellulaires ont été générées par infection rétrovirale à l'aide du vecteur pBabe-puro vide (RV) et la construction pBabe-puro/HNF4 α humain. Les virus générés ont été gracieusement offerts par le laboratoire du Pr François Boudreau (Lussier *et al.*, 2008). Les cellules ont été sélectionnées et cultivées dans du milieu DMEM (Wisent, St-Bruno, Québec) contenant 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (Wisent, St-Bruno, Québec), 2 mM de

glutamine (GlutaMax, Invitrogen Burlington, Ontario, Canada), 10mM d'HEPES (Wisent, St-Bruno, Québec) et 7,5µg/mL de puromycine, à 37°C dans une atmosphère humide (5% CO₂ et 95% air). Le milieu a été changé aux 2 jours et les cellules ont été réensemencées dans un ratio 1:5 à l'atteinte de la confluence.

2. Production de lentivirus

Les virus ont été produits en transfectant les vecteurs lentiviraux pLP1, pLP2 et pLP/VSVG, permettant l'expression des protéines d'encapsidation, ainsi que les constructions pLKO.1-puro/shCtrl et pLKO.1-puro/shHNF4α dans les cellules HEK 293T. Pour la transfection, les cellules ont étéensemencées dans des pétris de 100 mm de diamètre (5 000 000 cellules/pétris) tel que décrit précédemment. La transfection a été réalisée dans du milieu OptiMEM (Gibco, Invitrogen Burlington, Ontario, Canada) au moyen d'une solution de LipofectAMINE (LipofectAMINE 2000, Invitrogen Burlington, Ontario, Canada), en utilisant 6µg de chaque vecteur et selon les recommandations du manufacturier. Après 4h d'incubation à 37°C, le milieu de transfection a été changé pour du milieu de culture adapté aux HEK 293T. Après une incubation de 2 jours, le milieu de culture a été récupéré, filtré sur un filtre de 0,45 µm, aliquoté en volume de 700 µL et congelé à -80°C.

3. Infection lentivirale et rétrovirale

Les cellules Caco-2 et HT-29 ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits et conservées en culture jusqu'à 50% de confluence. Lors de l'infection virale, le milieu de culture a été remplacé par 700 µL de suspension virale contenant 4 µg/mL

de polybrène (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) frais. Au terme d'une incubation de 1h à 37°C dans une atmosphère humide (5% CO₂, 95% air), 1,3 mL de milieu de culture contenant 4 µg/mL de polybrène ont été ajouté à chaque puits. Les cellules ont été incubées 2 jours à 37°C, puis le milieu de culture a été remplacé par du milieu DMEM (Wisent, St-Bruno, Québec) contenant 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (Wisent, St-Bruno, Québec), 2 mM de glutamine (GlutaMax, Invitrogen Burlington, Ontario), 10mM d'HEPES (Wisent, St-Bruno, Québec) et 7,5µg/mL de puromycine, de façon à faire la sélection des cellules infectées.

4. Traitement des cellules

4.1. Détermination de la concentration de H₂O₂IL-1β à utiliser

Les cellules Caco-2 ont étéensemencées dans une plaque de 6 puits. À l'atteinte de la confluence, le milieu de culture a été remplacé par leur milieu de culture approprié dépourvu en sérum fœtal bovin. Après une période de 24h, les cellules ont été traitées pendant 4h avec des concentrations croissantes de H₂O₂ (50 µM à 300 µM) et d'IL-1β (Bioshop, Burlington, Ontario, Canada) (1ng/mL à 20 ng/mL), de façon à déterminer la concentration optimale de chacun des produits.

4.2. Traitement au H₂O₂ et à l'IL-1β

Les différents modèles cellulaires ont étéensemencés dans des plaques 6 puits, pétris de 60mm ou de 100mm de diamètre selon les besoins des différentes expériences. À l'atteinte de la confluence, le milieu de culture a été remplacé par le milieu de culture approprié dépourvu de sérum fœtal bovin. Suite à une incubation de

18 à 24h, les cellules IEC-6/RV, IEC-6/Cdx2 et IEC-6/Cdx2-HNF4 α ont été stimulées avec 50 μ M de H₂O₂ et 10 ng/mL d'IL-1 β , tandis que les autres types cellulaires ont été traités avec 200 μ M de H₂O₂ et 10 ng/mL d'IL-1 β pendant différents temps.

4.3. Traitement des cellules avec des inhibiteurs de voies de signalisation

Les cellules de la lignée Caco-2 ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits et maintenues jusqu'à l'atteinte de la confluence, à 37°C dans une atmosphère humide composée à 95% d'air et 5% de CO₂. Le milieu de culture a ensuite été remplacé par le milieu de culture approprié dépourvu en sérum fœtal bovin. Après une période de 24h, les cellules ont été prétraitées avec 10 μ M d'inhibiteur de JNK, le SP600125 (EMD Biosciences, Mississauga, Ontario) et 50 μ M l'inhibiteur du protéasome, le MG132 (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario), pendant respectivement 60 minutes et 90 minutes, précédemment au traitement de 60 minutes au H₂O₂ (200 μ M) et à l'IL-1 β (10 ng/mL). Les cellules ont également été traitées avec le DMSO comme contrôle négatif.

5. Analyse de l'expression ou des modifications des protéines cibles

5.1. Extraction des protéines totales

Suivant les différents traitements, les cellules ont été lysées dans un tampon de lyse à base de Triton (40 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,2 mM d'orthovanadate sodique, 40 mM de β -glycérophosphate, 0,1 mM de phénylméthyl-sulfonyl fluoride (PMSF) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich)) pendant 20 minutes à 4°C. Les extraits obtenus ont ensuite été

centrifugés à 15 600 g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant a été récolté. Les protéines ont été quantifiées à l'aide de la trousse BioRad Protein Assay reagent (BioRad Laboratories, Mississauga, ON) modifiée pour les dosages en plaque de 96 puits tel que décrit par le manufacturier.

5.2. Extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques

Suivant le traitement au H₂O₂ et à l'IL-1 β , les cellules ont été lavées avec du tampon PBS 1X, récupérées par centrifugation et resuspendues dans 100 μ L de tampon de lyse (100 mM HEPES, 1 mM EDTA, 60mM KCl, 1,2 mM PMSF, 1 mM DTT et NP-40, pH 7,9). Après une incubation de cinq minutes sur glace, les protéines cytoplasmiques ont été séparées par une centrifugation de 20 secondes à 15 600 g à température pièce (TP). Le culot a ensuite été resuspendu dans 100 μ L de tampon de resuspension nucléaire (250 mM Tris-base pH 7,8, 75 mM KCl, 1,2 mM PMSF et 1 mM DTT). Les noyaux ont été lysés par trois cycles alternant des incubations de deux minutes dans l'azote liquide et à 37°C. Les protéines nucléaires sont récupérées par centrifugation de 10 minutes à 15 600 g, à 4°C. Les protéines nucléaires ont été quantifiées tel que décrit à la section précédente.

5.3. Immunobuvardage de type Western

Une concentration de 20 μ g d'extraits protéiques a été utilisée pour réaliser les analyses d'immunobuvardage. La séparation des protéines par électrophorèse et le transfert de celles-ci sur membrane de PVDF (Millipore, Bedford, MA, États-Unis) ainsi que les immunobuvardages ont été réalisés tel que décrit précédemment dans le

laboratoire (Grbic *et al.*, 2008). La dilution, l'origine et le fournisseur de chacun des anticorps utilisés pour l'immunodétection des protéines d'intérêt sont présentés dans le tableau 3. Dans chaque cas, la détection des bandes spécifiques a été effectuée en incubant les membranes une heure à TP avec une dilution 1:10 000 d'anticorps anti-chèvre IgG, anti-souris IgG ou anti-lapin IgG conjugués à la peroxydase de raifort (HRP). La visualisation des signaux a été réalisée par autoradiographie en utilisant la trousse de chimiluminescence Immobilon Western de Millipore (Billerica, MA, USA). La normalisation des signaux a été effectuée en déshybridant les membranes pendant 20 minutes à TP à l'aide de la solution Restore Western Blot stripping buffer (Fisher Scientific, St-Laurent, QC) et par réhybridation avec les anticorps anti-actine et anti-lamine B, tel que nous l'avons précédemment décrit (Grbic, Degagné et al. 2008). L'intensité relative du signal a été déterminée par densitométrie en utilisant le logiciel QuantityOne de BioRad.

Tableau 3: Description des anticorps utilisés pour immunodétection des protéines cibles.

Anticorps	Origine	Type	Dilution	Fournisseur	Numéro catalogue
Anti-HNF4 α	Chèvre	Polyclonal	1/1000 pour le rat 1/3000 pour l'humain	Santa Cruz Biotechnology	sc-6556
Anti-NF κ B p65	Souris	Monoclonal	1/1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-8008
Anti-phospho NF κ B p65	Lapin	Monoclonal	1/1000	Cell Signaling Technologies	3033

Anti-I κ B	Souris	Monoclonal	1/2000	Cell Signaling Technologies	4814
Anti-actine	Souris	Monoclonal	1/10 000	Millipore	MAB1501R
Anti-lamine B	Chèvre	Monoclonal	1/1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-6216

5.4. Micropuce d'anticorps

Le criblage de plusieurs facteurs anti- et pro-inflammatoires exprimés au niveau des tissus coliques de souris sauvages et invalidées pour le gène *HNF4 α* a été effectué à l'aide d'une puce d'anticorps de la compagnie RayBiotech (RayBio® Mouse inflammation antibody array G series, RayBiotech, Norcross, GA, États-Unis) selon les recommandations du manufacturier. Pour ce faire, 40 μ g de protéines extraites de tissus coliques, gracieusement offerts par le laboratoire du Pr François Boudreau, ont été utilisés. La détection des signaux a été effectuée sur le canal Cy3 avec l'appareil ScanArray Express dual-color confocal laser scanner (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Les valeurs des signaux ont été normalisées par les données obtenues pour les puits vides.

5.5. ELISA

Les cellules Caco-2/shCtrl, Caco-2/shHNF4 α , HT-29/RV, HT-29/HNF4 α , IEC-6/RV, IEC-6/Cdx2 et IEC-6/Cdx2-HNF4 α ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits ou 24 puits, puis maintenues jusqu'à l'atteinte de la confluence dans un

environnement à 37°C, composé à 95% d'air et 5% de CO₂. À l'atteinte de la confluence, le milieu de culture a été remplacé par le milieu de culture approprié dépourvu de sérum fœtal bovin. Vingt-quatre heures suivant le changement de milieu, les cellules ont été traitées avec 50 µM d'H₂O₂ et 10 ng/mL d'IL-1β dans le cas des cellules IEC-6/RV, IEC-6/Cdx2 et IEC-6/Cdx2-HNF4α, tandis que les autres types cellulaires ont été traités avec 200 µM de H₂O₂ (H₂O₂) et 10 ng/mL d'IL-1β (IL-1β) pendant différents temps. Suite au traitement, le milieu de culture a été récupéré, congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C jusqu'à la réalisation des tests ELISA. Dans le cas des cellules Caco-2/shCtrl et Caco-2/shHNF4α, un décompte cellulaire a été effectué de façon à normaliser les données obtenues. La quantification de la sécrétion de CXCL1/KC par méthode ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN, États-Unis) a été réalisée conformément aux recommandations du manuel de l'utilisateur. Une dilution 1/5 des échantillons a été utilisée pour procéder aux ELISA. La détection colorimétrique a été faite en utilisant un spectromètre VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, États-Unis).

Également, suite aux différents traitements, les protéines totales ont été extraites en lysant les cellules avec 0,5 mL de tampon de lyse 1X provenant de la trousse PathScan® Inflammation Multi-Target Sandwich ELISA Kit (Cell signaling Technology), en soniquant les lysats sur glace puis en récupérant le surnageant après une centrifugation de 10 minutes à 15 600 g à 4°C. La détection de la phosphorylation de la tyrosine 705 de STAT3 a été réalisée à l'aide de la trousse PathScan® Inflammation Multi-Target Sandwich ELISA Kit (Cell signaling Technology), selon les directives du manufacturier. Une dilution 1/2 des échantillons a été utilisée pour

procéder à ELISA. La détection colorimétrique a été faite en utilisant un spectromètre VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, États-Unis).

6. Analyse de la liaison des facteurs de transcription à l'ADN

6.1. Hybridation des sondes et radiomarquage

Des amorces complémentaires correspondant aux séquences consensus des facteurs de transcription HNF4 α et NF κ B ainsi que celles correspondant aux séquences identifiées sur le promoteur de *CXCL1* (tableau 4) ont été hybridées de façon à former des sondes d'ADN double brin. Pour se faire, 25 μ g de chaque oligonucléotides ont été mélangés, complétés avec de l'eau stérile de façon à obtenir un volume de 50 μ L puis chauffés à 75°C pendant deux minutes. Ensuite, la température a été abaissée graduellement jusqu'à température pièce afin de permettre l'appariement. Les sondes ainsi formées ont été radiomarquées par incorporation d'ATP contenant le radio-isotope 32 P en position gamma (γ - 32 P-ATP). Pour se faire, les sondes ont été incubées à 37°C pendant 45 minutes en présence de γ - 32 P-ATP et de l'enzyme T4 DNA polynucleotide kinase (PNK), puis purifiées sur colonnes illustra MicroSpin™ G-50 (GE Health Care, Piscataway, NJ, États-Unis) selon les recommandations du manufacturier. Ensuite, 1 μ L de la sonde a été ajouté à 5 mL de liquide à scintillation (GE Health Care, Piscataway, NJ, États-Unis) de façon à quantifier l'activité du marquage des sondes à l'aide d'un compteur à scintillation Wallac (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Les sondes ont été conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Tableau 4 : Séquence des sondes utilisées pour réaliser les études de liaison des facteurs de transcription à l'ADN.

Nom de la sonde	Séquences de la sonde
HNF4 α consensus	5'-AGGTCAAAGGTCAC-3'
NF κ B consensus	5'-GGGAATTTCC-3'
CXCL1 #1	5'-CGGGCTGCATCAGTGGACCC-3'
CXCL1 #2	5'-TCGGGATCGATCTGGAAGTC-3'

6.2. Gel de rétention

Afin d'évaluer la capacité de liaison des facteurs de transcription à leur séquence consensus, des extraits nucléaires provenant de cellules traitées ont migré sur gel de d'acrylamide 5% non-dénaturant en présence des sondes radiomarquées au ^{32}P . Brièvement, les échantillons nucléaires ont été préparés dans un tampon de liaison (10 mM HEPES, 10% glycérol, 100 μM EDTA, 250 μM PMSF) auxquels ont été ajoutés 50 mM de KCl, 50 ng de polydeoxyinosinate-polydeoxycytidylate (Roche Molecular Biochemicals, Allemagne) et un volume de sonde correspondant à 50 000 cpm d'activité. La migration a été effectuée à 120 V pendant trois heures et demie dans un tampon contenant 1,9 M de glycine, 0,25 M de Tris et 14 mM d'EDTA. Le gel a ensuite été séché à 80°C pendant 1h à l'aide de l'appareil Slab Gel Dryer ThermoEC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis). Le retard sur gel

des bandes spécifiques a été provoqué par la pré-incubation de certains échantillons avec 3 µg d'anticorps spécifiques aux facteurs de transcription étudiés, soient contre HNF4α et NFκB-p65 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, États-Unis). La visualisation des bandes a été réalisée en exposant le gel à un écran capteur de phosphore (Imaging Screen-K, BioRad Laboratories, Mississauga, ON) pour une période de deux jours et en détectant les signaux à l'aide du scanner Typhoon (GE Health Care, Piscataway, NJ, États-Unis).

7. Analyse de l'expression des gènes d'intérêt

7.1. Extraction de l'ARN total

L'ARN total des cellules Caco-2/shCtrl, Caco-2/shHNF4α, HT-29/RV et HT-29/HNF4α traitées a été extrait selon le protocole utilisant le Trizol® (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Les cellulesensemencées dans des plaques de 6 puits ont été lysées en les incubant avec 1 ml de Trizol pendant 5 à 10 minutes à la température de la pièce, avec agitation. L'ARN a été extrait en ajoutant 200µL d'une solution phénol : chloroforme : alcool isoamyl (25 :24 :1, v/v) (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Les échantillons ont été vigoureusement agités pendant 15 secondes et laissés à la température de la pièce pendant 3 minutes. La phase aqueuse, contenant l'ARN, a été séparée de la phase organique par centrifugation de 15 minutes à 10 200 g, à TP. La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau microtube et 500 µL d'isopropanol ont été ajoutés à chaque tube pour précipiter l'ARN. Après 10 minutes d'incubation à TP, les échantillons ont été centrifugés à 10 200 g pendant 10 minutes à TP. Le surnageant a été enlevé et les culots d'ARN ont été lavés avec 1 ml d'éthanol

75%. L'éthanol a été enlevé des tubes et le culot de l'ARN a été séché à l'air avant d'être dissout dans 30 µL d'eau exempte de RNAses.

7.2. Quantification de l'ARN total

L'ARN total a été quantifié par spectrophotométrie en lisant la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 260 nm. La concentration a été calculée en utilisant la formule suivante: $DO \times \text{facteur de dilution} \times 0,04$. La longueur d'onde de 280 nm a aussi été prise afin d'effectuer le ratio 260/280 qui indique si l'ARN est contaminé. Ce ratio est idéal si le résultat se situe entre 1,8 et 2,0.

7.3. Production d'ADN complémentaire

L'ADN complémentaire (ADNc) correspondant à l'ARN messenger (ARNm) extrait a été obtenu grâce à la technique de polymérisation en chaîne utilisant la transcriptase inverse (RT-PCR). Les réactions de RT-PCR ont été réalisées dans un volume final de 20 µL à l'aide de la trousse SuperScript II Reverse Transcriptase d'Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada), tel que décrit par le manufacturier. Brièvement, 1µL d'oligonucléotides dT₁₅ (500 µg/mL) et 1µL de dNTP (10 mM) ont été ajoutés à 2 µg d'ARN puis le volume a été complété à 12 µL avec de l'eau exempte de nucléases. Les échantillons ont été chauffés à 65°C pendant 5 minutes pour empêcher l'appariement des amorces, après quoi ils ont rapidement été placés sur glace. Après une brève centrifugation, les éléments suivants ont été ajoutés: 4 µL de First stand buffer 5X, 2µL de 0,1 M de DTT et 0,5µL d'inhibiteur de RNase de GE Health Care (Piscataway, NJ, États-Unis). Les ingrédients ont été mélangés à la pipette

et pré-incubés deux minutes à 42°C. La réaction de transcription inverse a été démarrée par l'addition de 0,5 µL de SuperScript II Reverse Transcriptase (200 unités). Les échantillons ont alors été incubés pendant 50 minutes à 42°C. La polymérase a été inactivée en chauffant les tubes pendant 15 minutes à 75°C. Les ADNc ainsi générés ont été conservés à -20°C ou utilisés immédiatement pour les analyses par PCR.

7.4. PCR quantitatif

La quantification de l'expression de la chimiokine CXCL1 ainsi que les gènes contrôles GAPDH et TBP (Tableau 5) dans les tissus humains a été réalisée par PCR quantitatif en temps réel à partir d'ADNc provenant des lignées cellulaires Caco-2/shCtrl, Caco-2/shHNF4 α , HT-29/RV et HT-29/HNF4 α . Le PCR quantitatif (qPCR) permet de comparer et de quantifier des niveaux d'expression de gènes d'intérêt dans différents échantillons. Les gènes GAPDH et TBP ont été utilisés comme référence pour normaliser la quantité d'ADNc dans les échantillons, il est donc important que son expression varie le moins possible entre les différents groupes expérimentaux. De plus, un calibrateur de même nature que les échantillons expérimentaux, mais qui n'a subi aucune modification est utilisé. Le mélange de départ pour les réactions de qPCR a été réalisé selon le protocole établi pour la trousse Brilliant SYBR® Green QPCR Master Mix (La Jolla, CA, États-Unis) dans des microtubes (10µl) (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada) spécialement conçu pour l'appareil Rotor-gene Q de QIAGEN.

Tableau 5: Séquences des amorces utilisées pour le PCR quantitatif.

Gène	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')	Taille (pb)
CXCL1, humain	AGGGAATTCA CCCCAAGAAC	CACCAGTGAG CTTCCTCCTC	204
TBP, humain	TGAGGATAAGA GAGCCACGAA	GAGCACAAGG CCTTCTAACCT	196
GAPDH, humain	CGGAGTCAACG GATTGGTTCG	AGCCTTCTCCAT GGTGGTGAAGAC	300

8. Analyse de l'activation du promoteur d'intérêt par les facteurs de transcription par essai luciférase

8.1. Transformation bactérienne et extraction d'ADN plasmidique

La construction du promoteur humain de CXCL1 suivi du gène rapporteur de la luciférase dans le vecteur pGL2 a été gracieusement offerte par la Dr Ann Richmond, de l'école de Médecine de l'Université Vanderbilt à Nashville (Nirodi *et al.*, 2001). Les ADNs plasmidiques de cette construction et des vecteurs d'expression contenant les gènes des facteurs de transcription HNF4 α et NF κ B-p65 ont été amplifiés par transformation bactérienne. Pour ce faire, 10 μ g d'ADN plasmidique ont été ajoutés à la préparation de bactéries compétentes. Le mélange a été incubé sur la glace pendant 30 minutes. Un choc thermique a ensuite été induit aux bactéries en chauffant à 42°C pendant deux minutes. Les bactéries ont été refroidies sur la glace pendant quatre minutes et 500 μ L du milieu LB ont ensuite été ajoutés aux bactéries. Les bactéries ont été agitées pendant une heure à 37°C. Puis, 100 μ L de mélange bactérien ont été étalés sur du milieu LB agar contenant de l'ampicilline pour ensuite être incubées à 37° C pendant environ 18h. Après cette période d'incubation, 5 ml

(MiniPrep) ou 50ml (MidiPrep) de milieu LB contenant de l'ampicilline ont été ensemencé avec les bactéries transformées et ont été incubés à 37°C pendant 16 à 18h à agitation constante. L'extraction de l'ADN plasmidique a été réalisée en utilisant la trousse d'extraction QIAprep Miniprep ou HiSpeed Plasmid Midikit de Qiagen (Mississauga, ON, Canada).

8.2. Transfection transitoire

Les cellules cancéreuses colorectales humaines Caco-2 ont été ensemencées dans une plaque de 24 puits et maintenues jusqu'à atteindre 70 % de confluence pour la transfection. Une heure avant d'effectuer la transfection, le milieu de culture a été remplacé par 300 µL de milieu OptiMEM (Gibco BRL, Burlington, Ontario). Chaque condition fut évaluée en triplicata. Les expériences ont été répétées quatre fois de façon indépendante.

Un total de 0,1 µg d'ADN plasmidique de la construction du promoteur de la chimiokine CXCL1 couplé au gène de la luciférase et 0,1 µg d'ADN plasmidique de vecteur vide ont été utilisés pour la transfection transitoire suivant la méthode utilisant la LipofectAMINE 2000 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Le vecteur pRL SV40-Rénilla (Promega, Madison, États-Unis) (0,1 ng) a été ajouté à chaque mélange d'ADN afin d'évaluer l'efficacité de transfection dans chacun des puits. Pour chaque réaction, correspondant à un puits, 2 µL de LipofectAMINE 2000 ont été pré-incubés avec 48 µL du milieu OptiMEM pendant 5 minutes à la température de la pièce. Quant aux ADNs plasmidiques, ils ont été pré-incubés dans 150 µL de milieu OptiMEM. Suivant cette étape, le mélange de LipofectAMINE a été ajouté au

mélange d'ADNs et incubé pendant 20 minutes à TP. Un volume de 100 µL de mélange réactionnel a été ajouté à chaque puits. Après cinq heures d'incubation dans un environnement humide à 37°C composé à 95% d'air et 5% de CO₂, le milieu a été remplacé par le milieu DMEM approprié.

8.3. Lyse cellulaire et essai luciférase

L'essai luciférase a été réalisé 48 heures suivant la transfection tel que décrit précédemment dans le laboratoire (Grbic et al., 2008). Les résultats ont été normalisés par rapport à l'activité de la luciférase de la Rénilla (Promega, Madison, Etats-Unis) et l'activité de la luciférase a été comparée avec l'activité du vecteur vide.

9. Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation a été réalisé en utilisant 400 µg de protéines totales extraites des cellules Caco-2 traitées, incubés 18h avec 6 µg d'anticorps dirigé contre HNF4α (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Etats-Unis) ou 6 µg d'un IgG de chèvre, utilisé comme contrôle. Les protéines ciblées ont été récupérées par une incubation avec 40 µL de billes de shépharose couplées à la protéine A (GE Health Care, Piscataway, NJ, États-Unis) préalablement gonflées dans du tampon de lyse Triton, suivie d'une centrifugation de 5 minutes à 2300 g à 4°C. Les complexes formés entre les protéines d'intérêts et les billes ont été lavés 3 fois au tampon Triton, puis chauffés 5 minutes à 95°C, pour finalement être déposés sur gel de polyacrylamide de 10 % (SDS-PAGE). Les immunobuvardages dirigés contre NFκB-p65 et HNF4α ont été réalisés tel décrit au point 5.3.

III- Résultats

1. Des conditions pro-inflammatoires amènent une augmentation des niveaux protéiques et de l'activité de HNF4 α dans les cellules Caco-2.

Étant un facteur de transcription constitutivement actif, l'activité de HNF4 α est régulée par différentes modifications qui vont, dans certains cas, affecter la stabilité du facteur ou sa liaison à l'ADN (Soutoglou *et al.*, 2000, Xu *et al.*, 2007, Hong *et al.*, 2003). Nous avons donc, comme premier objectif de recherche, voulu déterminer l'effet d'un stress pro-inflammatoire sur l'expression et l'activité de HNF4 α . Pour ce faire, nous avons d'abord traité les cellules Caco-2 avec du peroxyde d'hydrogène et de l'interleukine-1 β , mimant ainsi un stress inflammatoire, puis évaluer les niveaux protéiques de HNF4 α par immunobuvardage. La figure 5A montre un résultat représentatif de trois expériences distinctes. Nous observons sur cette figure qu'il y a augmentation marquée des niveaux protéiques de HNF4 α après trois heures de traitement avec 200 μ M de H₂O₂ et 10 ng/mL d'IL-1 β ainsi qu'une augmentation plus modérée après 6h de traitement. Il fallait également déterminer par quel mécanisme se faisait l'augmentation protéique de HNF4 α . Pour ce faire, nous avons évalué l'implication de la kinase de stress *Jun N-terminal Kinase* (JNK) par utilisation d'un inhibiteur de son activité, soit le SP600125. Suivant un traitement d'une heure au SP600125, les cellules Caco-2 ont été traitées avec 200 μ M de H₂O₂ et 10 ng/mL d'IL-1 β pendant 1h et 3h. Les niveaux protéiques de HNF4 α ont ensuite été détectés par immunobuvardage. Nous avons constaté que l'inhibition de l'activité de la kinase JNK empêche l'augmentation des niveaux protéiques de HNF4 α obtenue

Figure 5 : Des conditions de stress inflammatoire amènent une augmentation des niveaux protéiques de HNF4 α et une augmentation de sa liaison à l'ADN

Les cellules Caco-2 ont été stimulées avec 200 μ M de H₂O₂ et 10 ng/mL d'IL-1 β pendant différents temps.

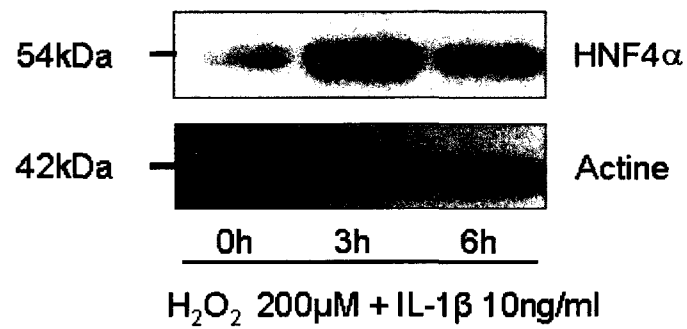
A) Les niveaux protéiques de HNF4 α ont été détectés par un immunobuvardage dirigé contre HNF4 α . La figure montre une forte augmentation de l'expression de HNF4 α après 3h de traitement au H₂O $_2$ et à l'IL-1 β . Les niveaux d'expression de l'actine sont également présentés comme contrôle de chargement du gel de polyacrylamide.

B) L'activité de HNF4 α a été vérifiée en évaluant sa capacité de liaison à l'ADN. Le gel de retardement montre la liaison de HNF4 α à sa sonde consensus radiomarquée suite à un traitement au H₂O $_2$ et à l'IL-1 β . On observe une augmentation de la liaison de HNF4 α à l'ADN à 30 minutes et 6h de traitement comparativement aux conditions contrôles et aux autres conditions de traitement.

Les deux figures sont représentatives de 3 expériences différentes.

En conditions de stress inflammatoire, les niveaux protéiques de HNF4 α sont augmentés ainsi que sa liaison à l'ADN

A)



B)

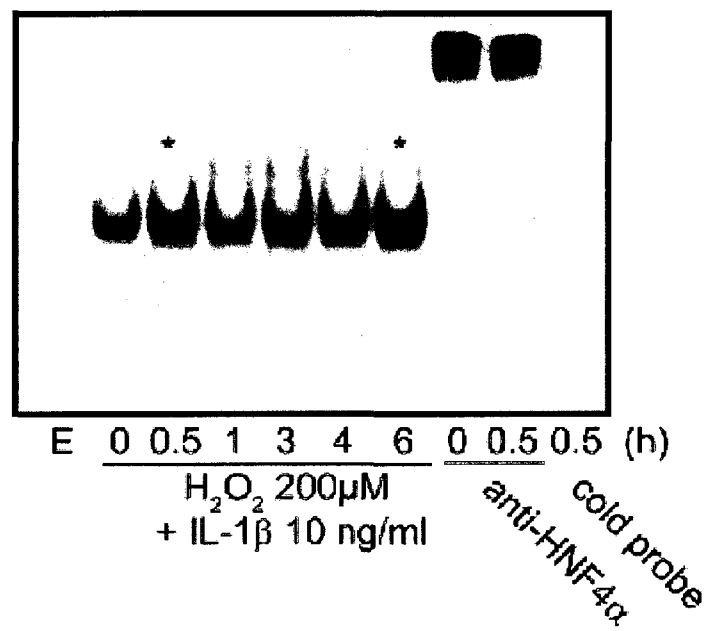


Figure 6 : L'augmentation protéique de HNF4 α est dépendante de l'activité de la kinase de stress JNK, en conditions de stress inflammatoire.

Les cellules Caco-2 ont été traitées avec 200 μ M de H₂O₂ et 10 ng/mL d'IL-1 β pendant 1h et 3h. Les cellules avaient été préalablement traitées avec l'inhibiteur de la kinase JNK, le SP600125 (10 μ M), ou le DMSO comme contrôle. Les niveaux d'expression de HNF4 α ont été détectés par immunobuvardage. La figure montre qu'un traitement au H₂O₂ et à l'IL-1 β précédé d'un traitement au SP600125 empêche l'augmentation des niveaux protéiques de HNF4 α tel qu'obtenue après une heure de traitement au H₂O₂ et à l'IL-1 β précédé d'un traitement au DMSO. Les niveaux d'expression de l'actine sont également montrés comme contrôle de chargement. Cette figure est un exemple représentatif de 3 expériences différentes.

L'inhibition de la kinase JNK empêche l'augmentation protéique de HNF4 α

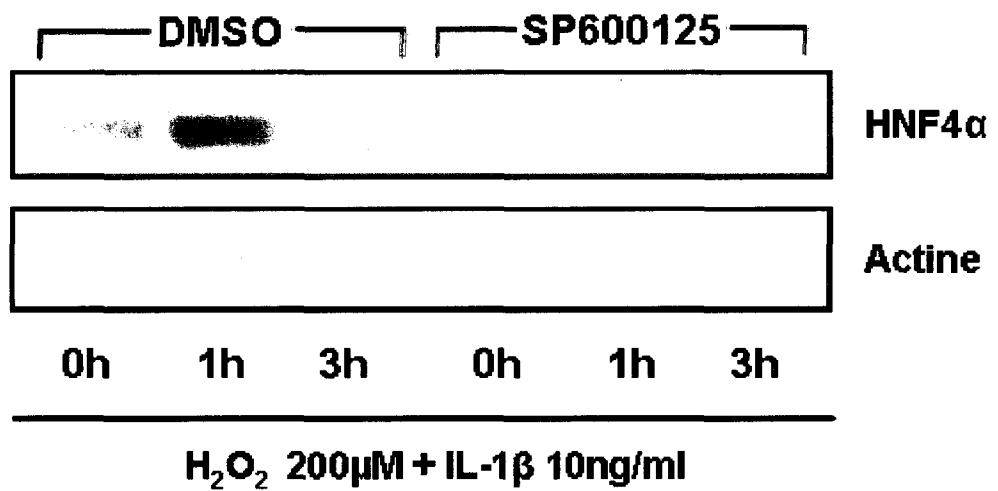
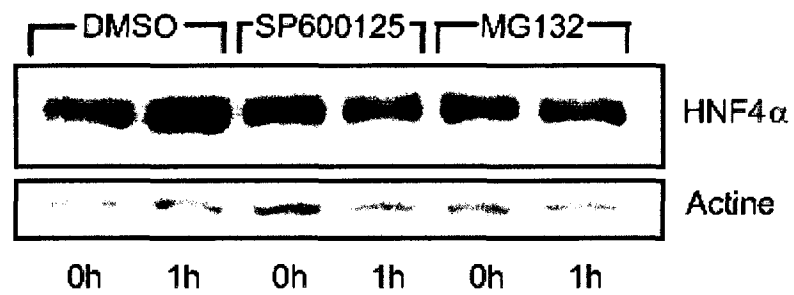


Figure 7 : L'inhibition du protéasome ne prévient pas la diminution des niveaux protéiques de HNF4 α entraînée par l'inhibition de la kinase de stress JNK.

Les cellules Caco-2 ont été préalablement traitées avec l'inhibiteur de JNK, le SP600125 (10 μ M), et/ou un inhibiteur du protéasome, le MG132 (50 μ M), puis ont été traitées avec 200 μ M de H₂O₂ et 10 ng/mL d'IL-1 β pendant 1h. Ensuite, les niveaux protéiques de HNF4 α ont été détectés par immunobuvardage. La figure montre que l'inhibition de la kinase JNK par le SP600125, empêche l'augmentation protéique de HNF4 α tel qu'observée après une heure de traitement au peroxyde d'hydrogène et à l'interleukine-1 β précédé d'un traitement au DMSO. De plus, l'inhibition du protéasome par le MG132 conjointement à l'inhibition de JNK par le SP600125, ne permet pas de ramener l'augmentation protéique de HNF4 α obtenue par un traitement au peroxyde d'hydrogène et à l'interleukine-1 β . Cette figure est un exemple représentatif de 3 expériences différentes.

La diminution des niveaux protéiques de HNF4 α suite à l'inhibition de JNK n'est pas associée à l'activité du protéasome.



suite au traitement pro-inflammatoire (Figure 6). De plus, l'inhibition du protéasome par le MG132 conjointement à l'inhibition de JNK par le SP600125 ne permet pas de rétablir les niveaux protéiques de HNF4 α observés suite au traitement au H₂O₂ et IL-1 β (Figure 7). Dans chaque cas, la détection des niveaux d'expression de l'actine a été utilisée comme contrôle de chargement et pour s'assurer de l'intégrité des protéines.

Également, l'activité de HNF4 α a été vérifiée en évaluant sa capacité de liaison à l'ADN. Le gel de retardement, présenté à la figure 5B, montre la liaison de HNF4 α à sa sonde consensus radiomarquée suite à un traitement au H₂O₂ et IL-1 β . On observe une augmentation de la liaison de HNF4 α à l'ADN à 30 minutes et 6h de traitement comparativement aux conditions contrôles et aux autres conditions de traitement.

2. Criblage des facteurs inflammatoires produits au niveau des tissus coliques de souris de type sauvage et de souris invalidées pour le gène HNF4 α .

Plusieurs groupes de recherche ont étudié la perte de HNF4 α au niveau du foie et du côlon, à différents stades du développement (Duncan *et al.*, 1997; Parviz *et al.*, 2003; Garrison *et al.*, 2006; Darsigny *et al.*, 2009). Une de ces études s'est avérée très pertinente pour la mise en place de notre projet de recherche. L'étude de Darsigny et ses collaborateurs a montré que la perte de HNF4 α au niveau de l'épithélium du côlon de souris menait à l'apparition spontanée d'inflammation avant l'âge d'un an. En effet, le modèle de délétion conditionnelle de HNF4 α au niveau des tissus coliques de souris présente des symptômes s'apparentant à la colite ulcéreuse. Les animaux

invalidés montrent un allongement des cryptes, une désorganisation de celles-ci et une infiltration importante de cellules immunitaires (Darsigny *et al*, 2009). La présence de cellules leucocytaires, étant attirées par différentes molécules inflammatoires, suggère une sécrétion importante de facteurs pro-inflammatoires au niveau des tissus coliques. Afin d'évaluer la production et la modulation de l'expression de cytokines par les tissus de côlon des souris conditionnellement invalidées pour le gène *HNF4α*, modèle utilisant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de la viline, nous avons effectué un criblage de plusieurs facteurs inflammatoires à l'aide de la puce d'anticorps RayBio® Mouse inflammation antibody array G series, de la compagnie RayBiotech. Les résultats obtenus sont divisés par classes de molécules inflammatoires et sont détaillés dans le tableau 6. On note une augmentation de la production de plusieurs facteurs inflammatoires au niveau de tissus coliques des souris invalidées pour le gène *HNF4α*, dont notamment une augmentation de l'expression de KC/CXCL1, un important chimioattractant pour les neutrophiles.

Tableau 6: La perte de *HNF4α* au niveau des tissus coliques de souris entraîne une production accrue de facteurs pro-inflammatoires.

Facteurs Proinflammatoires			
Classe/Noms	Contrôles	Mutantes	Augmentation
Chimiokines			
Eotaxine	4186,00 ± 1908,09	4503,75 ± 1141,5	1,1
Eotaxine-2	794,33 ± 119,19	1402,75 ± 372,8	1,8
Fractalkine	564,67 ± 150,97	752,00 ± 214,6	1,3
I-TAC	209,33 ± 64,92	724,38 ± 140,3	3,5
KC/CXCL1	78,83 ± 19,96	354,50 ± 65,1	4,5
LIX	196,33 ± 96,98	873,00 ± 169,0	4,4
Lymphotactine	306,00 ± 143,93	935,13 ± 198,1	3,1
MCP-1	109,50 ± 14,00	218,13 ± 43,1	2,0
MIG	122,00 ± 27,27	393,25 ± 77,0	3,2

Classe/Noms	Contrôles	Mutantes	Augmentation
Chimiokines (suite)			
MIP-1 α	108,67 \pm 30,49	281,13 \pm 51,7	2,6
MIP-1 γ	21774,17 \pm 2083,51	24224,50 \pm 7639,6	1,1
RANTES	552,83 \pm 280,78	1835,75 \pm 709,2	3,3
SDF-1	905,67 \pm 618,64	2757,13 \pm 1125,3	3,0
TCA-3	192,83 \pm 44,76	1724,63 \pm 566,3	8,9
TECK	90,17 \pm 46,22	378,25 \pm 28,6	4,2
Cytokines			
GCSF	447,33 \pm 95,02	320,13 \pm 38,1	0,7
GM-CSF	125,50 \pm 51,69,	527,75 \pm 74,4	4,2
IFN- γ	300,00 \pm 84,07	1593,25 \pm 1180,6	5,3
IL-1 α	597,33 \pm 175,06	2546,13 \pm 798,5	4,3
IL-1 β	135,33 \pm 20,69	453,38 \pm 112,8	3,4
IL-2	1528,83 \pm 1208,96	2455,75 \pm 895,6	1,6
IL-3	181,67 \pm 25,07	374,25 \pm 90,7	2,1
IL-6	85,17 \pm 30,13	304,13 \pm 61,9	3,6
IL-12p40p70	22,17 \pm 14,15	268,75 \pm 66,7	12,1
IL-12p70	346,33 \pm 183,79	543,13 \pm 120,1	1,6
IL-17	209,67 \pm 86,24	1823,13 \pm 625,4	8,7
Leptine	123,33 \pm 45,46	477,38 \pm 108,0	3,9
MCSF	100,17 \pm 41,16	592,50 \pm 189,4	5,9
TNF α	239,67 \pm 8,01	611,50 \pm 73,0	2,6
Protéines membranaires			
CD30 ligand	35,50 \pm 25,03	455,75 \pm 161,7	12,8
Fas ligand	27,17 \pm 14,04	870,13 \pm 735,7	32,0
Inhibiteurs de métallopeptidases			
TIMP-1	876,83 \pm 294,83	1372,38 \pm 181,1	1,6
TIMP-2	189,17 \pm 43,73	654,25 \pm 126,6	3,5
Facteurs anti-inflammatoires			
Cytokines			
IL-4	1455,67 \pm 1176,55	370,00 \pm 53,1	0,3
IL-10	567,67 \pm 493,32	827,38 \pm 236,4	1,5
IL-13	223,67 \pm 59,93	755,13 \pm 104,1	3,4
Récepteurs solubles			
sTNF RI	8162,17 \pm 879,65	8909,88 \pm 2228,4	1,1
sTNF RII	1891,50 \pm 271,02	2923,50 \pm 838,3	1,5

3. Les tissus coliques de souris invalidées pour le gène *HNF4α* ont une expression accrue de KC/CXCL1

Les souris invalidées pour le gène de *HNF4α* au niveau des tissus coliques présentent une production accrue de plusieurs facteurs pro-inflammatoires, dont notamment la chimiokine KC/CXCL1. Cette chimiokine est principalement impliquée dans l'attraction des neutrophiles, mais elle participerait également à la chimiotaxie et l'activation des basophiles, des éosinophiles, des monocytes et des lymphocytes, suggérant une importance majeure dans l'inflammation chronique (Laing et Secombes, 2004). Également, KC/CXCL1 est connue pour être un facteur de croissance autocrine et promouvoir l'angiogenèse dans la sarcome de Kaposi (Wang *et al.*, 2006). Ces divers rôles dans l'inflammation et la carcinogenèse ainsi que sa modulation par la perte de *HNF4α* ont suscité chez nous un intérêt pour l'étude de cette molécule. Nous avons d'abord validé par méthode ELISA l'augmentation de KC/CXCL1 au niveau des tissus coliques des souris invalidées pour *HNF4α*. Comme le montre la figure 8, les souris ayant la délétion du gène *HNF4α* montrent une augmentation significative de l'expression de KC/CXCL1 au niveau de leurs tissus coliques comparativement aux souris de types sauvages.

4. Validation de la surexpression de *HNF4α* dans les cellules IEC-6 et HT-29 ainsi que de l'inhibition de l'expression de *HNF4α* dans les cellules Caco-2

De façon à nous permettre de répondre au troisième objectif de recherche, soit de déterminer les mécanismes de régulation de *HNF4α* sur la production de la chimiokine pro-inflammatoire CXCL1, nous avons généré différents outils, soient

Figure 8: Les tissus coliques de souris invalidées pour le gène *HNF4α* ont une expression accrue de KC/CXCL1

L'expression de la chimiokine KC/CXCL1 au niveau des extraits protéiques issus des tissus coliques de souris sauvages et de souris invalidées pour le gène *HNF4α* a été quantifiée par méthode ELISA. Les échantillons ont été dilués 1/5 pour réaliser l'ELISA. Le graphique montre ici les résultats obtenus pour 6 souris sauvages et 5 souris invalidées. La moyenne des résultats est représentée par la ligne horizontale. L'augmentation de l'expression de KC/CXCL1 chez les souris invalidées par rapport aux souris de type sauvage est significative (test de t non apparié où $*p < 0,05$).

Les tissus coliques de souris invalidés pour le gène *HNF4a* ont une expression accrue de KC/CXCL1

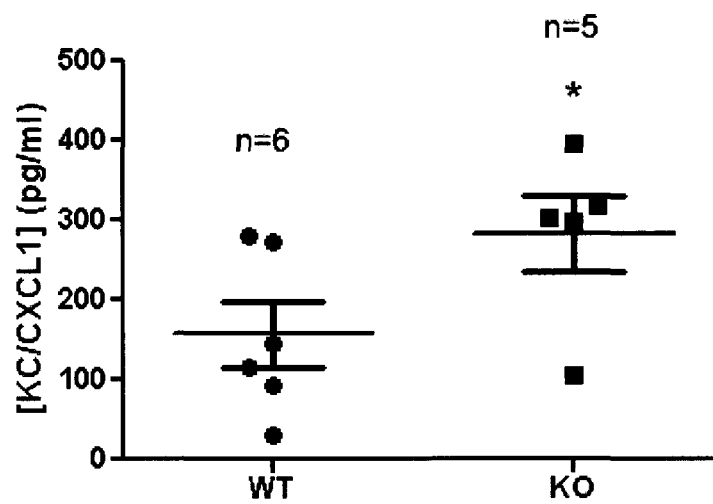
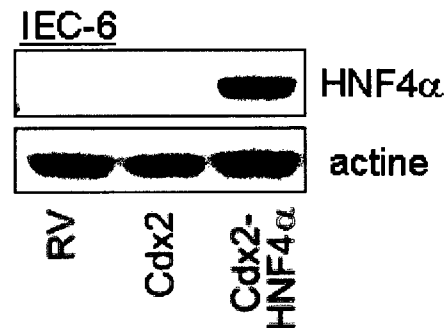


Figure 9: Validation de la surexpression de HNF4 α dans les cellules IEC-6, HT-29 et de la répression de l'expression de HNF4 α dans les cellules Caco-2.

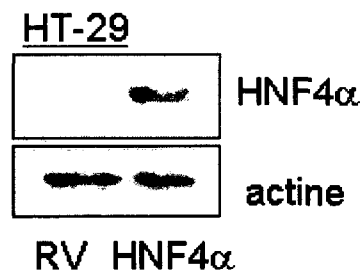
Le gène *HNF4 α* a été surexprimé dans les cellules HT-29 et IEC-6 lesquelles expriment de faibles niveaux ou n'expriment pas HNF4 α . Cette surexpression a été réalisée par infection virale, tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. La surexpression a été vérifiée et confirmée par immunobuvardage dirigée contre la protéine HNF4 α , dans les cellules IEC-6 (A) et HT-29 (B). L'expression de HNF4 α a également été diminuée par utilisation de shARNs dirigés contre l'ARNm de HNF4 α , dans les cellules Caco-2. Cette diminution est observée par immunobuvardage (C). Les numéros de référence des deux shARN utilisés apparaissent au bas de la figure.

Validation de la surexpression de HNF4 α dans les cellules IEC-6 et HT-29 (A, B) ainsi que de l'inhibition de l'expression de HNF4 α dans les cellules Caco-2 (C).

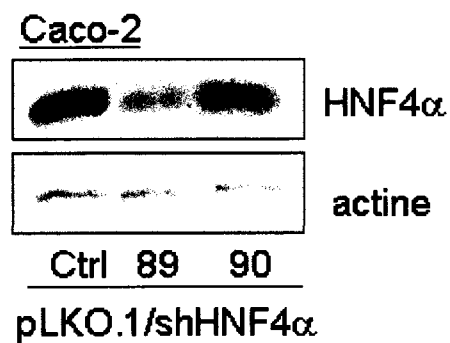
A)



B)



C)



89: NM_000457.3 – 362-382
90: NM_000457.3 – 1271-1291

trois lignées cellulaires où l'expression de HNF4 α a été augmentée ou diminuée. Le gène *HNF4 α* a été surexprimé dans les cellules HT-29 et IEC-6 lesquelles expriment de faibles niveaux ou n'expriment pas HNF4 α au niveau basal. Cette surexpression a été réalisée par infection virale, tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. La surexpression a été vérifiée et confirmée par immunobuvardage dirigé contre la protéine HNF4 α , dans les cellules IEC-6 (Figure 9A) et HT-29 (Figure 9B). L'expression de HNF4 α a également été diminuée par utilisation de shARN dirigés contre l'ARNm de HNF4 α , dans les cellules Caco-2. Cette diminution est observée par immunobuvardage (Figure 9C).

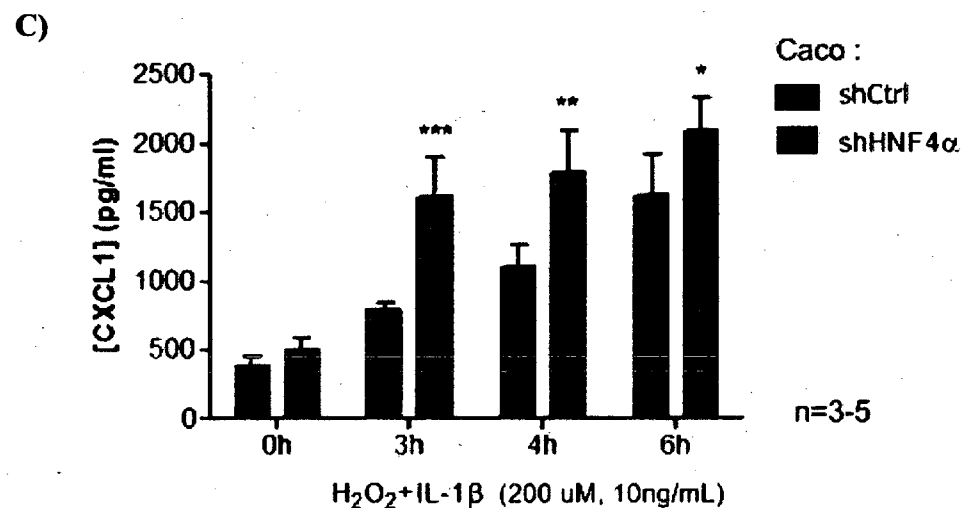
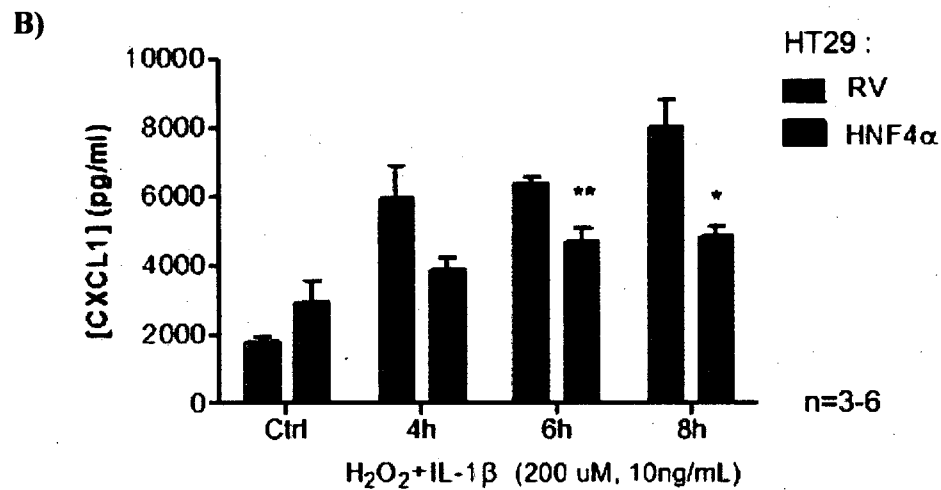
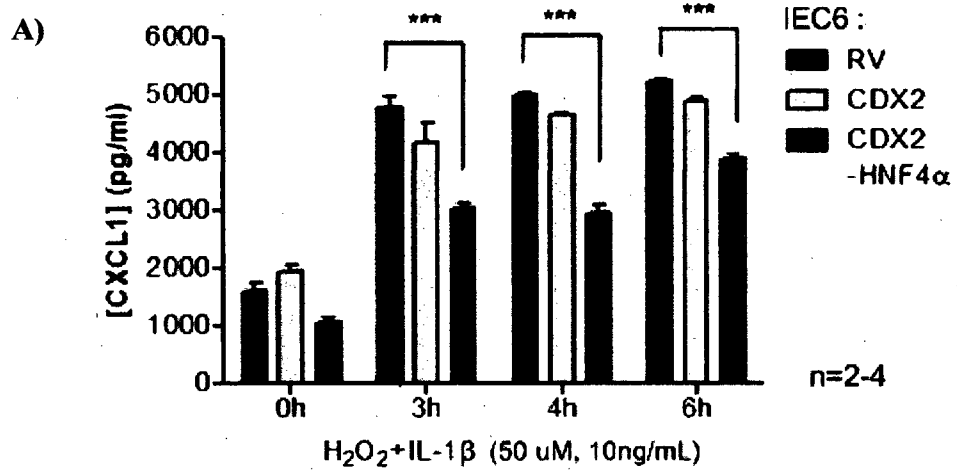
5. En conditions inflammatoires, la production de CXCL1 est diminuée dans les cellules exprimant le facteur de transcription HNF4 α .

Nous avons confirmé par méthode ELISA que l'expression de la chimiokine KC/CXCL1 était augmentée au niveau des tissus coliques des souris invalidées pour le gène *HNF4 α* comparativement aux souris de types sauvages. Cependant, l'expérience a été réalisée avec des extraits totaux de tissus de côlon. Afin d'évaluer si la hausse de l'expression de CXCL1 était attribuable à une augmentation de sa production par les cellules épithéliales intestinales ayant la délétion du gène *HNF4 α* , nous avons utilisé les différents modèles de cellules épithéliales où l'expression de HNF4 α a été augmentée ou diminuée. Nous avons donc traité ces différents types cellulaires avec du H₂O₂ et de l'IL-1 β . La quantification de la production de KC/CXCL1 par les différents types cellulaires a été réalisée par méthode ELISA sur le milieu de culture. Les trois graphiques présentant la quantification de la sécrétion

Figure 10 : En conditions inflammatoires, la production de CXCL1 est diminuée dans les cellules exprimant le facteur de transcription HNF4 α .

Les différents types cellulaires ont été stimulés avec du H₂O₂ et de l'IL-1 β , le milieu de culture a été récupéré. La quantification de la production de CXCL1 par les différents types cellulaires a été réalisée par méthode ELISA. Les échantillons de milieu cellulaire ont été dilués 1/5 pour réaliser cette expérience. Les trois graphiques présentant la quantification de la sécrétion de CXCL1 par les cellules IEC-6 (A), HT-29 (B) et Caco-2 (C), montrent qu'il y a diminution significative de cette sécrétion lorsque le facteur de transcription HNF4 α est exprimé (test «2 way ANOVA où *p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001).

En conditions inflammatoires, la production de CXCL1 est diminuée dans les cellules exprimant le facteur de transcription HNF4 α .



de KC/CXCL1 par les cellules IEC-6 (Figure 10A), HT-29 (Figure 10B) et Caco-2 (Figure 10C), montrent une diminution significative de cette sécrétion lorsque le facteur de transcription HNF4 α est surexprimé et une augmentation significative de la relâche de CXCL1 lorsque l'expression de HNF4 α est inhibée.

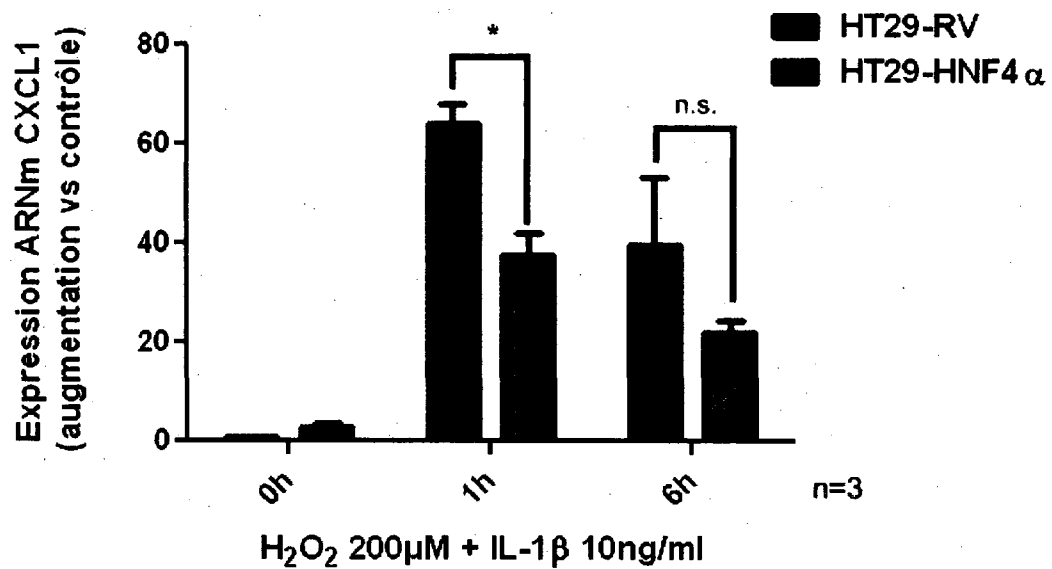
6. Le transcrit de CXCL1 est diminué dans les cellules épithéliales surexprimant le facteur de transcription HNF4 α .

Ayant montré que l'expression et la sécrétion de la chimiokine KC/CXCL1 varient avec l'expression du facteur de transcription HNF4 α , nous avons vérifié si cette modulation était également observable au niveau transcriptionnel. Pour ce faire, nous avons recueilli l'ARNm des cellules HT-29/RV, HT-29/HNF4 α , Caco-2/shCtrl et Caco-2/shHNF4 α traitées ou non au peroxyde d'hydrogène et à l'interleukine-1 β . L'expression du transcrit de CXCL1 a été quantifiée par PCR quantitatif en temps réel. L'expression du transcrit du gène de référence *GAPDH* a été utilisée pour normalisée chacune des expériences. Comme le montre la figure 11A, après une heure de traitement inflammatoire, le transcrit de CXCL1 est modulé à la baisse lorsque le facteur de transcription HNF4 α est surexprimé dans les cellules HT-29 comparativement au niveau d'expression du transcrit de CXCL1 dans les cellules où l'expression de HNF4 α n'est pas affectée. Tandis que le graphique de la figure 11B affiche une augmentation significative de l'expression du transcrit de CXCL1 dans les cellules Caco-2/shHNF4 α après 1h et 6h de traitement comparativement aux cellules Caco-2/shCtrl.

Figure 11 : Le transcrit de CXCL1 est diminué dans les cellules épithéliales surexprimant le facteur de transcription HNF4 α .

Les cellules ont été traitées avec 200 μ M H₂O₂ et 10 ng/mL d'IL-1 β pendant 1h et 6 h. L'expression de l'ARNm de CXCL1 a été quantifiée par PCR quantitatif en temps réel et normalisée par l'expression du gène de référence *GAPDH*. Le graphique en A montre qu'il y a diminution significative de l'expression de l'ARNm de CXCL1 dans les cellules surexprimant HNF4 α après une heure de traitement. Tandis que le graphique B affiche une augmentation significative de l'expression du transcrit de CXCL1 dans les cellules Caco-2/shHNF4 α après 1h et 6h de traitement comparativement aux cellules Caco-2/shCtrl. La significativité statistique a été déterminée par un test «2 way ANOVA » où * p <0,05 et ** p <0,01.

A) Le transcrit de CXCL1 est diminué dans les cellules épithéliales surexprimant le facteur de transcription HNF4 α .



B) Le transcrit de CXCL1 est augmenté suite à la diminution de l'expression de HNF4 α

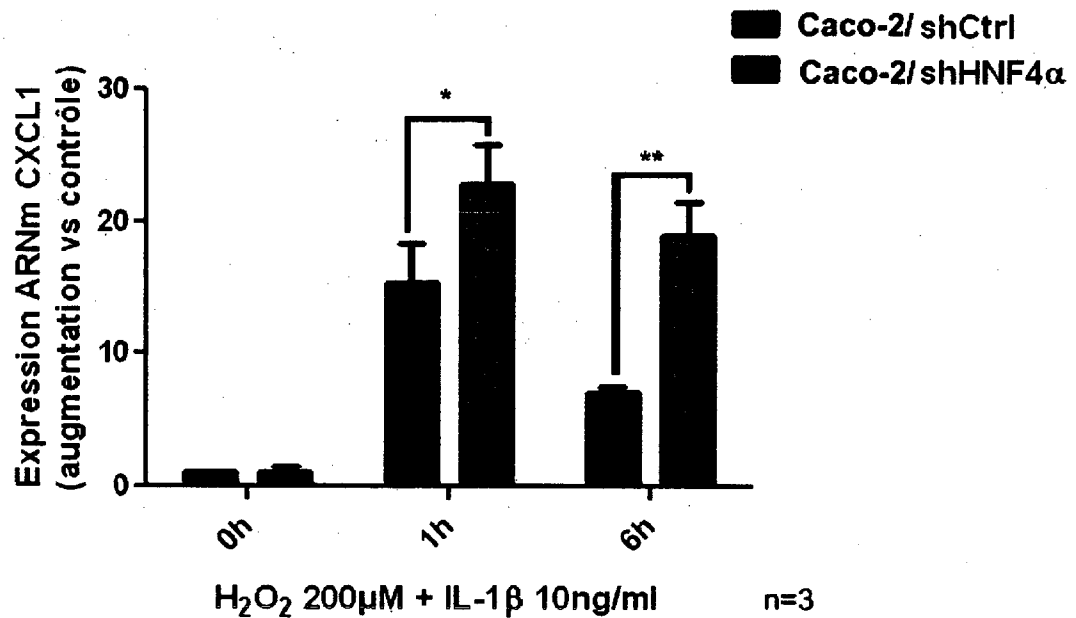
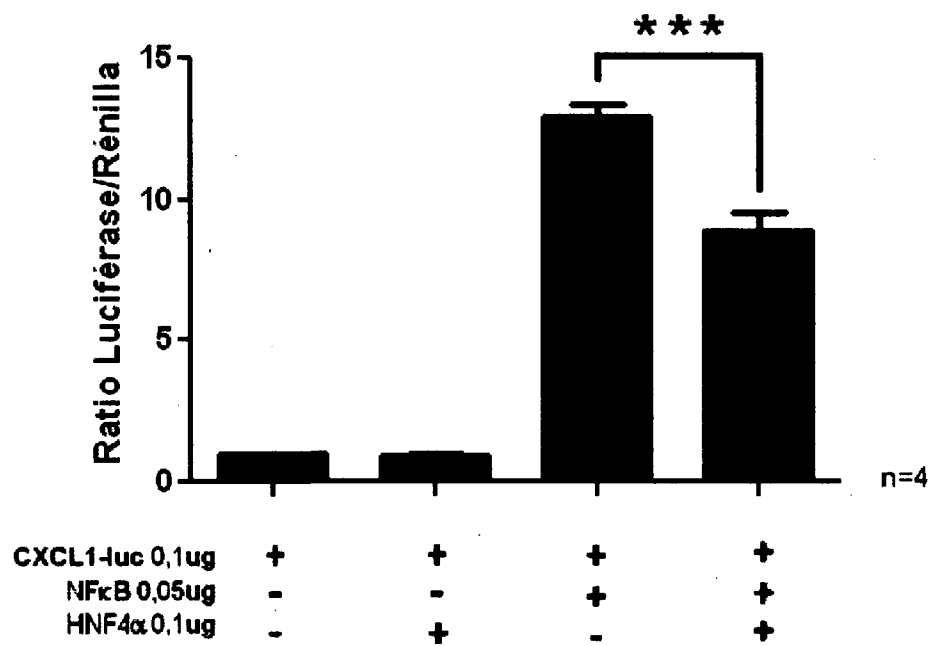


Figure 12 : La présence de HNF4 α réduit la capacité de NF κ B d'activer le promoteur de *CXCL1*.

Les cellules Caco-2 ont été cotransfectées avec le promoteur de CXCL1 couplé au gène de la luciférase et les vecteurs d'expression contenant les facteurs de transcription HNF4 α et NF κ B, tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. La luciférase a été quantifiée et normalisée par les valeurs de Rénilla, le contrôle de transfection. Le graphique représente la compilation de 4 expériences réalisées en triplicata. La significativité statistique a été déterminée par un test de t non apparié où ***p<0,001 en comparaison avec la transfection avec le promoteur et le facteur NF κ B.

La présence de HNF4 α réduit la capacité de NF κ B d'activer le promoteur de *CXCL1*



7. La présence de HNF4 α réduit la capacité de NF κ B d'activer le promoteur de *CXCL1*.

Il a été rapporté que la transcription de *CXCL1* est assurée par un promoteur minimal de 306 paires de bases et est régulée par le facteur de transcription NF κ B (Nirodi *et al.*, 2001). Nous avons présenté précédemment, que la modulation de l'expression de *CXCL1* obtenue par la surexpression du facteur HNF4 α , se fait au niveau transcriptionnel. En effet, le transcrit de *CXCL1* est diminué lorsque HNF4 α est surexprimé dans les cellules HT-29 (Figure 11A). Nous avons donc évalué la capacité de HNF4 α à réduire la transcription assurée par NF κ B.

Les cellules Caco-2 ont donc été cotransfectées avec le promoteur de *CXCL1* couplé au gène de la luciférase (*CXCL1-luc* fourni par le Pr Ann Richmond, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, États-Unis) et les vecteurs d'expression contenant les facteurs de transcription HNF4 α et NF κ B-p65, tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. La luciférase a été quantifiée et normalisée par les valeurs de Rénilla, le contrôle de transfection. La figure 12 représente la compilation de 4 expériences réalisées en triplicata. Sur ce graphique, on observe que le facteur NF κ B, transfecté seul, a la capacité d'activer fortement le gène de la luciférase, montrant que NF κ B active le promoteur de *CXCL1*. Cependant, la transfection de HNF4 α réduit d'environ 30% l'activation du gène de la luciférase lorsque co-transfecté avec le facteur NF κ B.

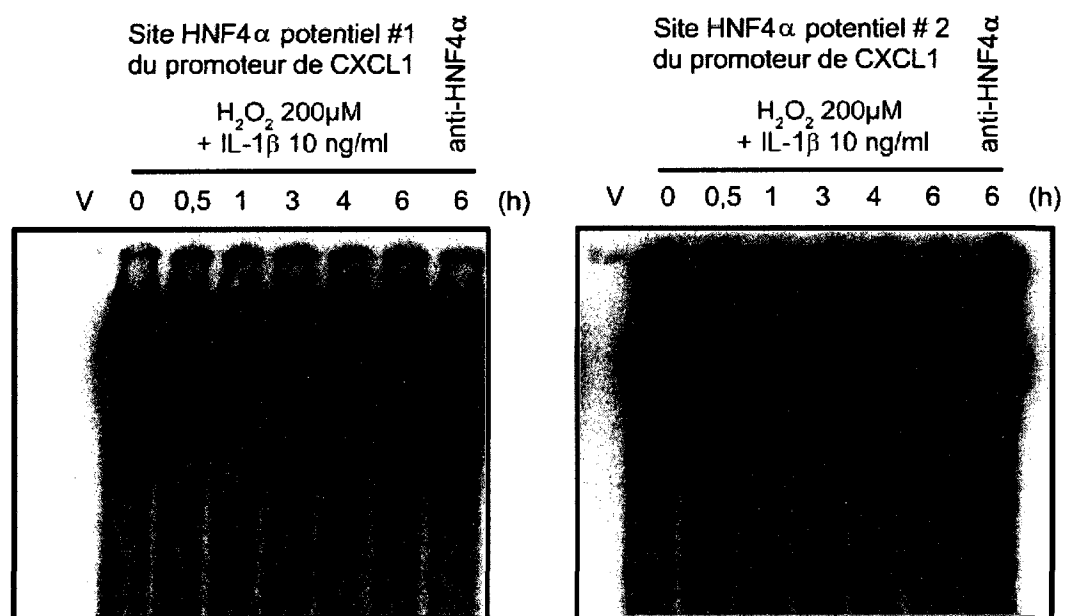
8. Le facteur de transcription HNF4 α ne lie pas le promoteur du gène *CXCL1* suite à la stimulation des cellules Caco-2 avec du H₂O₂ (200 μ M) et IL-1 β (10ng/mL).

Nous avons montré que l'activation du promoteur de *CXCL1* assurée par le facteur NF κ B est réduite par la présence du facteur de transcription HNF4 α . À ce titre, nous nous sommes intéressés aux mécanismes par lesquels HNF4 α pourrait réduire la capacité de NF κ B d'activer le promoteur du gène *CXCL1*. Nous avons suggéré la possibilité que HNF4 α puisse faire compétition à NF κ B pour la liaison à l'ADN. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons d'abord recherché au niveau du promoteur de *CXCL1* des sites potentiels de liaison pour le facteur de transcription HNF4 α . Deux sites potentiels ont été identifiés, lesquels sont adjacents au site de liaison de NF κ B. Nous avons évalué, par gel de rétention, la capacité de HNF4 α de lier ces sites putatifs. Les échantillons protéiques nucléaires extraits des cellules Caco-2 traitées avec H₂O₂ (200 μ M) et IL-1 β (10ng/mL) ont migré sur gel de rétention en présence de chacune des deux sondes radiomarquées correspondant aux sites identifiés. La figure 13 est un exemple représentant les résultats obtenus pour différents essais. Sur cette figure de gel de rétention, nous observons la formation de complexe entre les extraits nucléaires et les sondes constituant des sites potentiels de liaison de HNF4 α à l'ADN. Afin de confirmer si le facteur de transcription HNF4 α est bien impliqué dans ce complexe, des essais de retardement ont été effectués en utilisant un anticorps dirigé contre le facteur HNF4 α . Toutefois, l'ajout d'un anticorps spécifique contre HNF4 α ne permet pas d'observer un retard des bandes sur le gel, suggérant que HNF4 α n'est pas lié aux sondes radiomarquées.

Figure 13 : Le facteur de transcription HNF4 α ne lie pas le promoteur du gène *CXCL1* suite à la stimulation des cellules Caco-2 avec du H₂O₂ (200 μ M) et IL-1 β (10ng/mL).

Les échantillons protéiques nucléaires ont été extraits des cellules Caco-2 traitées avec H₂O₂ (200 μ M) et IL-1 β (10ng/mL). Le gel de rétention montre la formation d'un complexe entre les extraits nucléaires et les sondes constituant des sites potentiels de liaison de HNF4 α à l'ADN. Cependant, l'ajout d'un anticorps spécifique contre HNF4 α ne permet pas d'observer un retard des bandes sur le gel, suggérant que ce n'est pas HNF4 α qui est lié aux sondes radiomarquées. La figure est représentative de quatre essais de gel de retardement.

Le facteur de transcription HNF4 α ne lie pas le promoteur du gène *CXCL1* suite à la stimulation des cellules Caco-2 avec du H₂O₂ (200 μ M) et IL-1 β (10ng/mL).



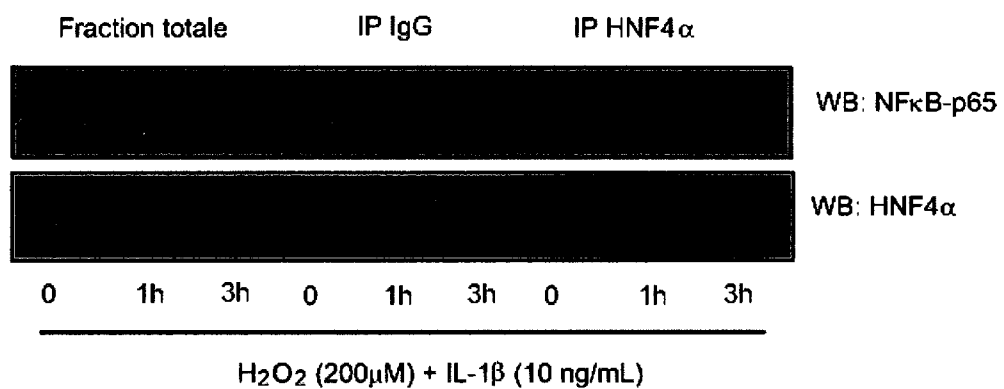
9. En conditions de stress inflammatoire, HNF4 α n'interagit pas physiquement avec le facteur NF κ B.

Étant donné que HNF4 α ne semble pas lier le promoteur de *CXCL1*, mais que ce dernier facteur a la capacité de réduire l'effet transcriptionnel de NF κ B, nous avons évalué la possibilité que HNF4 α puisse interagir avec NF κ B. Pour ce faire, des essais d'immunoprécipitation ont été réalisés avec les échantillons protéiques extraits des cellules Caco-2 traitées au H₂O₂ (200 μ M) et IL-1 β (10ng/mL) pendant 1h et 3h, en utilisant le facteur de transcription HNF4 α comme appât. Nous avons ensuite voulu détecter par immunobuvardage la présence du facteur NF κ B. Cependant, l'immunodétection de la sous-unité p65 de NF κ B n'a révélée aucune bande spécifiquement associée à NF κ B. La figure 14 montre que NF κ B est détectée dans la fraction totale des extraits protéiques, mais qu'il est absent de l'immunoprécipité. La détection de HNF4 α par immunobuvardage confirme que l'immunoprécipitation à bien fonctionnée. L'utilisation d'un IgG de chèvre comme contrôle négatif témoigne de la spécificité de l'immunoprécipitation et que les IgGs en soit ne permettent pas de récupérer HNF4 α . Les bandes observées sur la figure d'immunobuvardage suite à l'immunoprécipitation contrôle avec l'IgG de chèvre, ont été détectées par l'anticorps secondaire utilisé pour l'immunobuvardage dirigé contre HNF4 α , soit l'anticorps anti-chèvre et correspondent aux IgG utilisés pour immunoprécipitation. utilisant le facteur de transcription HNF4 α comme appât. Nous avons ensuite voulu détecter par immunobuvardage la présence du facteur NF κ B. Cependant, l'immunodétection de la sous-unité p65 de NF κ B n'a révélée aucune bande spécifiquement associée à NF κ B.

Figure 14 : En conditions de stress inflammatoire, HNF4 α n'interagit pas physiquement avec le facteur NF κ B.

Les cellules Caco-2 ont été traitées avec H₂O₂ (200 μ M) et IL-1 β (10ng/mL) pendant 1h et 3h. Des essais de co-immunoprécipitation ont été réalisés en utilisant le facteur de transcription HNF4 α comme appât. Cependant, la détection de NF κ B par immunobuvardage dirigé contre la sous-unité p65 de NF κ B, n'a révélée aucune bande spécifiquement associée à NF κ B. La figure montre que NF κ B est détecté dans la fraction totale des extraits protéiques, mais qu'il est absent de l'immunoprécipité. La détection de HNF4 α par immunobuvardage confirme que l'immunoprécipitation à bien fonctionnée. L'utilisation d'un IgG de chèvre comme contrôle négatif confirme que l'immunoprécipitation est spécifique et que les IgGs en soit ne permettent pas de récupérer HNF4 α . Les bandes observées sur la figure d'immunobuvardage suite à l'immunoprécipitation contrôle avec l'IgG de chèvre, ont été détectées par l'anticorps secondaire utilisé pour l'immunobuvardage dirigé contre HNF4 α , soit l'anticorps anti-chèvre, et correspondent aux IgG utilisés pour immunoprécipitation. La figure est un exemple représentatif de 3 essais différents.

En conditions de stress inflammatoire, HNF4 α n'interagit pas physiquement avec le facteur NF κ B.



10. La surexpression de HNF4 α dans les cellules HT-29 entraîne une diminution de l'activation du facteur de transcription NF κ B

Tel que présenté précédemment, le facteur de transcription HNF4 α réduit l'expression de la chimiokine CXCL1 et ce, en réduisant la transcription du gène assurée par le facteur NF κ B. À ce titre, nous avons démontré que la surexpression de HNF4 α dans les cellules HT-29 amène une diminution de l'activation NF κ B (figure 15). L'activation de NF κ B-p65 a été détectée par immunobuvardage dirigé contre la sous-unité p65 du facteur de transcription, réalisé sur la portion nucléaire des échantillons protéiques extraits des deux types cellulaires traités. La figure 15A montre que la translocation nucléaire de la sous-unité p65 en réponse au traitement au H₂O₂ et à l'IL-1 β varie selon l'expression de HNF4 α . En effet, les niveaux de NF κ B-p65 nucléaires sont diminués lorsque HNF4 α est surexprimé, tel qu'observé sur la figure 15 pour les cellules HT-29/HNF4 α comparativement aux cellules HT-29/RV. Les niveaux d'expression de la lamine ont été utilisés pour normaliser le signal obtenu par la détection de NF κ B-p65.

11. L'inhibition de l'expression de HNF4 α favorise l'activation de NF κ B ainsi que sa liaison à l'ADN, attribuable à une augmentation de la dégradation de I κ B α .

L'étude de Darsigny et ses collaborateurs portant sur l'implication de HNF4 α dans le maintien de l'homéostasie inflammatoire de l'intestin, suggérait que la perte de HNF4 α au niveau de l'épithélium du côlon de souris amenait l'augmentation de l'activité de NF κ B, puisqu'ils observaient chez ces souris une augmentation de la

Figure 15 : La surexpression de HNF4 α dans les cellules HT-29 entraîne une diminution de l'activation du facteur de transcription NF κ B

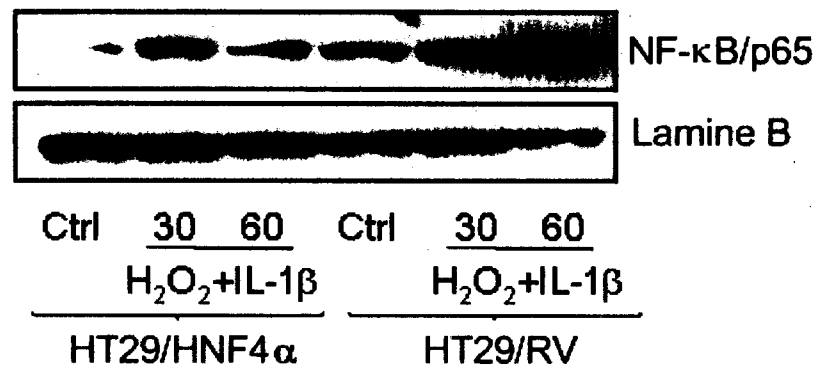
Les cellules HT-29/RV et HT-29/HNF4 α ont été stimulées avec 200 μ M H₂O₂ et 10 ng/mL d'IL-1 β pendant 30 et 60 minutes.

A) L'activation de NF κ B-p65 a été détectée par immunobuvardage dirigé contre la sous-unité p65 du facteur de transcription, réalisé sur la portion nucléaire des échantillons protéiques extraits des deux types cellulaires traités. La figure montre la différence d'activation de la sous-unité p65 suite au traitement au peroxyde d'hydrogène et à l'interleukine-1 β dans les cellules exprimant ou non HNF4 α . Les niveaux de NF κ B-p65 nucléaires sont diminués dans les cellules HT-29/HNF4 α par rapport aux cellules HT-29/RV.

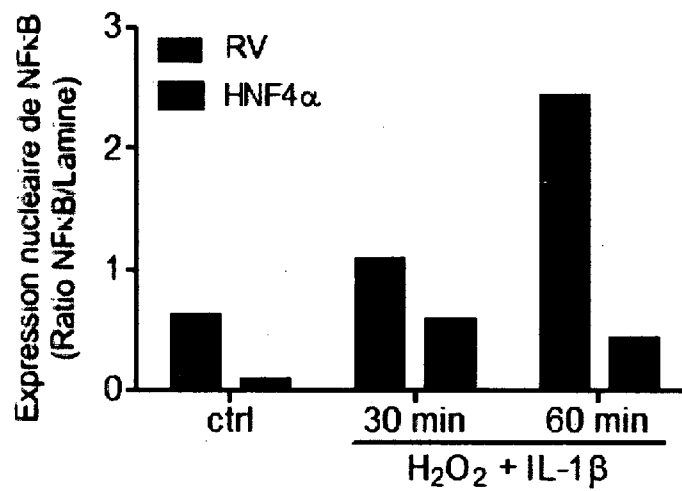
B) Représentation graphique de la figure en A, les niveaux de NF κ B-p65 nucléaires ont été normalisés par les niveaux d'expression de la lamine. Le graphique est un exemple représentatif de trois essais différents.

La surexpression de HNF4 α dans les cellules HT-29 entraine une diminution de l'activation du facteur de transcription NF κ B

A)



B)



phosphorylation de I κ B α , un signal de dégradation pour cette protéine (Darsigny *et al.*, 2009). Aussi, nous avons déterminé que la diminution de l'expression de HNF4 α dans les cellules Caco-2 par l'utilisation d'un shARN favorise l'activation de NF κ B (figure 16A). En effet, l'activation de NF κ B-p65 a été détectée par immunobuvardage dirigé contre la phosphorylation sur sérine 536 de la sous-unité p65 du facteur de transcription, dans les cellules Caco-2/shCtrl et Caco-2/shHNF4 α ayant été stimulées avec 200 μ M H₂O₂ et 10 ng/mL d'IL-1 β pendant 30 et 60 minutes. La phosphorylation de cette sérine témoigne de l'activation de NF κ B-p65. La figure 16 montre que l'activation de la sous-unité p65 en réponse au traitement au peroxyde d'hydrogène et à l'interleukine-1 β varie entre les cellules exprimant HNF4 α et les cellules où l'expression de HNF4 α a été diminuée par l'utilisation d'un shARN. Les signaux correspondant à la détection de la phosphorylation de la sérine 536 de p65 diminuée. Également, l'augmentation de la phosphorylation de NF κ B-p65 suite à la diminution de l'expression du facteur HNF4 α concorde avec l'augmentation de la dégradation de la protéine I κ B α . Les cellules Caco-2/shCtrl et Caco-2/shHNF4 α ont été traitées pendant 10, 20 et 30 minutes avec 200 μ M de peroxyde d'hydrogène et 10 ng/mL d'interleukine-1 β . On observe, sur la figure 17, que les niveaux protéiques de I κ B α diminuent avec le traitement au peroxyde d'hydrogène et l'interleukine-1 β . On note également que cette diminution est plus prononcée dans les cellules Caco-2/shHNF4 α . Aussi, nous avons montré que la diminution de l'expression de HNF4 α amène une augmentation de la liaison de NF κ B-p65 à l'ADN (Figure 16B). On observe, sur gel de rétention, la formation de complexes entre les protéines nucléaires extraites des cellules Caco-2/shCtrl et Caco-2/shHNF4 α et la sonde consensus de

Figure 16 : L'inhibition de l'expression de HNF4 α favorise l'activation de NF κ B ainsi que sa liaison à l'ADN

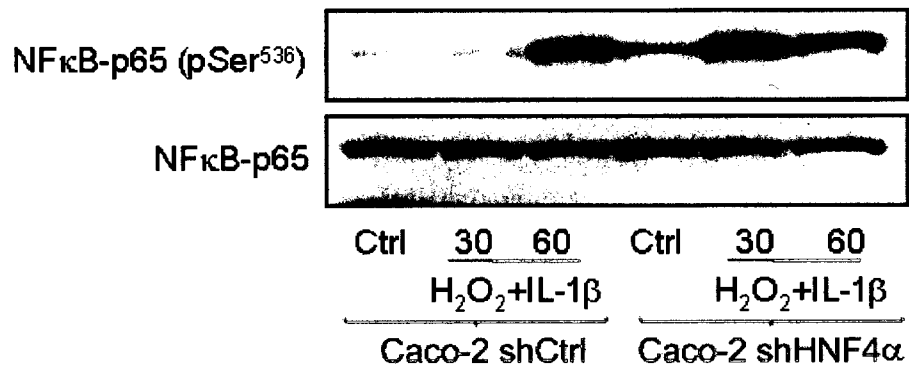
Les cellules Caco-2/shCtrl et Caco-2/shHNF4 α ont été stimulées avec 200 μ M H₂O₂ et 10 ng/mL d'IL-1 β pendant 30 et 60 minutes.

A) L'activation de NF κ B-p65 a été détectée par immunobuvardage dirigé contre la phosphorylation sur sérine 536 de la sous-unité p65 du facteur de transcription. La figure montre la différence d'activation de la sous-unité p65 suite au traitement au H₂O₂ et à l'IL-1 β dans les cellules exprimant HNF4 α et dans les cellules où son expression est diminuée par l'utilisation d'un shARN dirigé contre l'ARNm de HNF4 α . La phosphorylation de la sérine 536 de p65 est plus marquée dans les cellules Caco-2/shHNF4 α comme le témoigne l'intensité des bandes observées.

B) Gel de rétention montrant la liaison à l'ADN de NF κ B-p65. Les bandes apparaissant à la hauteur de la flèche correspondent à la liaison de NF κ B-p65 à la sonde consensus radiomarquée. La spécificité de ce complexe est confirmée par le retard de la bande, observé sur le gel lorsque l'anticorps contre NF κ B-p65 est ajouté. Les bandes correspondant au complexe formé entre la sonde et les échantillons protéiques nucléaires extraits des cellules Caco-2/shHNF4 α sont plus intenses que celles correspondant au complexe formé avec les extraits des cellules Caco-2/shCtrl.

L'inhibition de l'expression de HNF4 α favorise l'activation de NF κ B ainsi que sa liaison à l'ADN

A)



B)

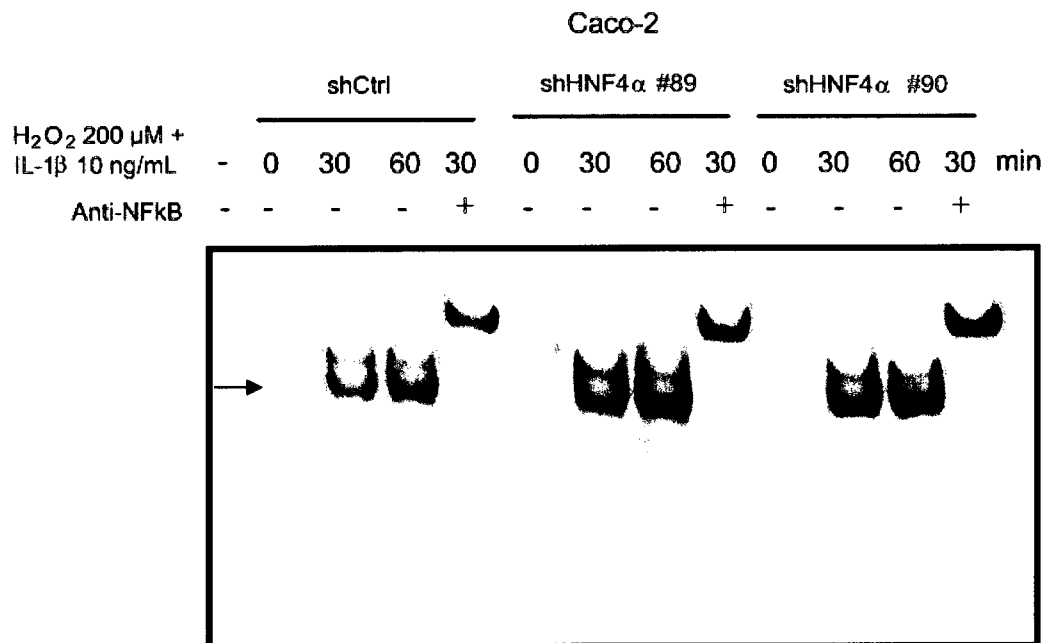
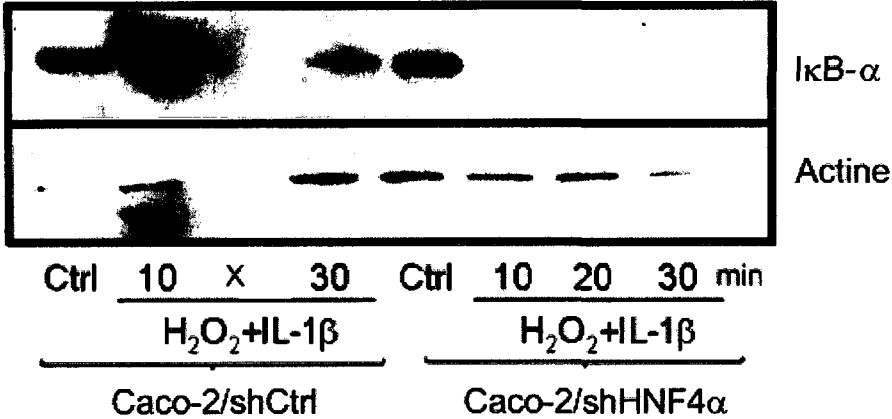


Figure 17 : La perte de HNF4 α dans la lignée cellules épithéliales intestinales Caco-2 amène une augmentation de la dégradation d'I κ B α

Les cellules Caco-2/shCtrl et Caco-2/sh HNF4 α ont été traitées pendant 10, 20 et 30 minutes avec 200 μ M de peroxyde d'hydrogène et 10 ng/mL d'interleukine-1 β . La dégradation de I κ B α a été évaluée en détectant par immunobuvardage la forme totale de I κ B α dans la fraction cytoplasmique d'extraits protéiques. On observe que les niveaux cytoplasmiques de I κ B α sont grandement diminués après 10 minutes de traitement et que cette diminution est maintenue jusqu'à 30 minutes de traitement, dans les cellules où l'expression de HNF4 α a été réduite par l'utilisation d'un shARN dirigé contre l'ARNm de HNF4 α . Tandis que les niveaux protéiques de I κ B α , dans les cellules Caco-2/shCtrl où l'expression de HNF4 α n'est pas affectée, sont plus élevés après 10 et 30 minutes de traitement comparativement aux niveaux observés dans les cellules Caco-2/sh HNF4 α .

Les cellules Caco-2 ayant une expression de HNF4 α diminuée montrent une augmentation de la dégradation de I κ B α .



NFκB radiomarquée. Ces complexes sont spécifiques à la liaison de NFκB à sa sonde, tel que confirmé par le retard sur gel par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la sous-unité p65 de NFκB. En comparant l'intensité de bandes correspondant aux complexes, on remarque que, lorsque l'expression de HNF4α est diminuée, la liaison de NFκB-p65 à l'ADN est augmentée.

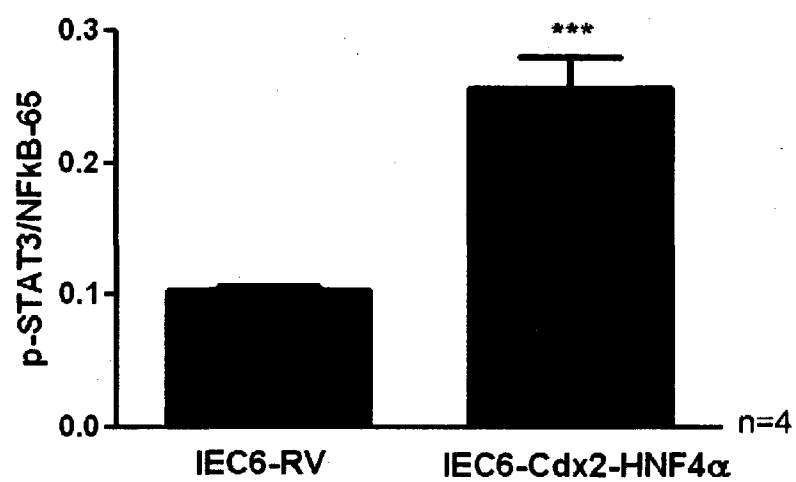
12. La phosphorylation de STAT3 est augmentée par la surexpression de HNF4α dans les cellules IEC-6.

Finalement, nous avons évalué l'activation de la protéine *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) dans les cellules IEC-6 surexprimant le facteur HNF4α, en détectant la phosphorylation de la tyrosine 705 à l'aide de la trousse PathScan® Inflammation Multi-Target Sandwich ELISA Kit de Cell signaling. Les résultats ont été normalisés par les niveaux détectés de la protéine NFκB-p65 totale, puisqu'il s'agissait du seul contrôle disponible dans la trousse de quantification. On observe sur le graphique de la figure 19 que la phosphorylation de la tyrosine 705 de STAT3 est plus élevée dans les cellules surexprimant le facteur HNF4α. Il est à noter que nous avons confirmé par immunobuvardage que l'augmentation de la phosphorylation de STAT3 était attribuable à la surexpression de HNF4α et non à la surexpression du facteur Cdx2 (résultats non présentés).

Figure 18 : La phosphorylation de STAT3 est augmentée par la surexpression de HNF4 α dans les cellules IEC-6.

L'activation de la protéine STAT3 dans les cellules IEC-6 surexprimant ou non le facteur HNF4 α , a été évaluée en détectant la phosphorylation de la tyrosine 705 par méthode ELISA. Les résultats ont été normalisés par les niveaux détectés de la protéine NF κ B-p65 totale. Le graphique montre que la phosphorylation de la tyrosine 705 de STAT3 est plus élevée dans les cellules surexprimant le facteur HNF4 α .

La phosphorylation de STAT3 est augmentée par la surexpression de HNF4 α dans les cellules IEC-6.



IV-Discussion

L'étude présentée dans ce mémoire suggère l'implication de HNF4 α dans la régulation de la réponse inflammatoire au point de vue intestinal, en attribuant à ce facteur un nouveau rôle dans la régulation de l'expression de la chimiokine pro-inflammatoire CXCL1 via l'inhibition de l'activité de NF κ B.

Le facteur de transcription HNF4 α fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires, en raison de son homologie structurale avec les membres de cette famille. Bien qu'il fasse partie de cette classe de récepteurs, HNF4 α est dit récepteur orphelin, puisqu'aucun ligand ne lui a clairement été attribué. Cependant, la présence d'un acide gras lié de façon permanente au niveau du domaine de liaison au ligand, lui confère une activité constitutive (Wisely *et al.*, 2002). Étant donné cette particularité, l'activité de HNF4 α est régulée par des interactions avec divers cofacteurs (Louet *et al.*, 2002, Iordonidou *et al.*, 2005, Torres-Padilla *et al.*, 2002, Qu *et al.*, 2007) et par différentes modifications post-traductionnelles (Soutoglou *et al.*, 2000, Xu *et al.*, 2007, Hong *et al.*, 2003), qui vont, dans certains cas, affecter la stabilité du facteur et/ou sa liaison à l'ADN. Il a d'ailleurs été rapporté que des conditions inflammatoires permettent la phosphorylation de la sérine 158 de HNF4 α par la MAPK p38 et que cette modification serait impliquée dans la régulation du gène *iNOS* au niveau des cellules hépatiques, en augmentant la liaison de HNF4 α au promoteur de ce gène (Guo *et al.*, 2006). Le facteur de transcription HNF4 α participe à la régulation de plusieurs processus biologiques, dont notamment au niveau du développement, de la différenciation cellulaire, mais également au niveau de la réponse inflammatoire.

Le rôle de HNF4 α dans la protection face aux maladies inflammatoires de l'intestin a été démontré par l'étude de Ahn et ses collaborateurs (Ahn *et al.*, 2008). Cette étude rapporte que l'expression de HNF4 α est perdue au niveau des tissus intestinaux chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin. Également, la délétion de HNF4 α au niveau de l'épithélium intestinal de souris amène une sensibilité accrue au traitement au sodium dextran sulfate (DSS) (Ahn *et al.*, 2008). À ce titre, nous avons d'abord évalué l'impact d'un stress inflammatoire, mimé par un traitement au peroxyde d'hydrogène et à l'interleukine-1 β , sur l'expression et l'activité de HNF4 α . Nous avons constaté que ces conditions inflammatoires entraînaient une augmentation des niveaux protéiques de HNF4 α , et ce, après une heure et trois heures de traitement (figure 5A). De plus, le traitement au peroxyde d'hydrogène et à l'interleukine-1 β permettent une meilleure liaison de HNF4 α à l'ADN, comme en témoigne les essais de gel de rétention présentés à la figure 5B. Étant donné qu'une augmentation aussi rapide des niveaux protéiques de HNF4 α ne peut être due à une augmentation de la synthèse de ce facteur, nous avons suggéré que HNF4 α puisse subir, en réponse au traitement inflammatoire, une modification post-traductionnelle augmentant sa stabilité et empêchant sa dégradation. Nous avons confirmé, par l'utilisation d'inhibiteurs de voies de signalisation, que la hausse des niveaux protéiques de HNF4 α était attribuable à l'activité de la kinase de stress JNK. En effet, l'inhibition de l'activité de JNK par le SP600125 prévient l'augmentation des niveaux protéiques de HNF4 α (figure 6) obtenue par le traitement au peroxyde d'hydrogène et à l'interleukine-1 β . Étant donné que nous suspectons que l'inhibition de la phosphorylation de HNF4 α par la kinase JNK menait la dégradation du facteur,

nous avons tenté de déterminer les mécanismes pouvant être responsables de ce phénomène. Nous avons donc évalué l'implication du protéasome dans ce phénomène, en nous basant sur une étude ayant rapporté la dégradation de HNF4 α via ce mécanisme suite à la phosphorylation de la sérine 78 par la protéine kinase C (Sun *et al.*, 2007). Cependant, l'inhibition du protéasome par le MG132 ne permet pas de contrecarrer l'effet de l'inhibition de JNK sur les niveaux protéiques de HNF4 α (figure 7). Le protéasome ne serait donc pas impliqué dans la perte de l'augmentation des niveaux protéiques de HNF4 α à la suite de l'inhibition de l'activité de la kinase de stress JNK. Une étude a déjà suggéré que la dégradation de HNF4 α pourrait être médiée par un mécanisme indépendant du protéasome, suivant la phosphorylation de HNF4 α par l'AMPK (Leclerc *et al.*, 2001). En effet, les auteurs constataient que l'inhibition du protéasome ne prévenait pas la dégradation de HNF4 α . Néanmoins, les auteurs n'ont pu démontrer par quel mécanisme HNF4 α était alors dégradé. Ceux-ci ont cependant suggéré que la phosphorylation par l'AMPK pourrait induire un changement conformationnel rendant HNF4 α plus susceptible à une dégradation par clivage protéolytique par des protéases cellulaires (Leclerc *et al.*, 2001).

Ainsi, nous avons montré que des conditions de stress inflammatoire vont moduler l'expression et l'activité de HNF4 α en augmentant les niveaux protéiques du facteur, à la suite de la phosphorylation par la kinase de stress JNK, et en augmentant la liaison de HNF4 α à l'ADN, suggérant son implication dans la réponse inflammatoire.

L'implication de HNF4 α dans l'homéostasie inflammatoire du côlon a récemment été discutée dans l'étude de Darsigny et ses collaborateurs. Cette étude

montre que la délétion du facteur HNF4 α au niveau de l'épithélium colique amène une réduction de l'expression de la claudine-15 et une déficience du transport épithélial des ions ce qui mènerait à l'apparition spontanée de maladies inflammatoires de l'intestin chez la souris (Darsigny *et al.*, 2009). Les auteurs ont observé que les animaux invalidés montraient un allongement des cryptes de Lieberkühn, une désorganisation de celles-ci et une infiltration importante de cellules leucocytaires au niveau des tissus coliques. De façon générale, les cellules immunitaires sont recrutées au site d'inflammatoire par chimiotaxie, selon un gradient de concentration de facteurs inflammatoires. Nous avons travaillé conjointement avec le groupe de Darsigny afin d'évaluer la production et la modulation de l'expression de cytokines par les tissus coliques des souris invalidées, pouvant justifier le recrutement de cellules immunitaires au niveau des tissus. La quantification des molécules pro-inflammatoires a été réalisée à l'aide de la puce d'anticorps RayBio® Mouse inflammation antibody array G series, de la compagnie RayBiotech, sur des extraits protéiques totaux de tissus coliques provenant de souris contrôles ou de souris invalidées pour HNF4 α . Par cette analyse, nous avons identifié plusieurs cytokines et chimiokines dont l'expression était modulée à la hausse au niveau du côlon des souris invalidées pour HNF4 α (tableau 6). Nous avons confirmé par ELISA que la chimiokine KC/CXCL1, à laquelle nous nous sommes plus particulièrement intéressés en raison de sa capacité à attirer les neutrophiles et plusieurs autres cellules immunitaires, était significativement augmentée dans les échantillons de tissus coliques de souris invalidées (figure 8). Cependant, nous ne pouvions confirmer que l'augmentation de KC/CXCL1 était attribuable à la production et la sécrétion par les

cellules épithéliales intestinales, puisque l'expérience a été effectuée sur des échantillons totaux extraits des tissus coliques de souris invalidées pour le gène *HNF4α*. Les souris invalidées montrent une forte infiltration leucocytaire qui pourrait être responsable de l'augmentation des niveaux protéiques de la chimiokine KC/CXCL1. Afin de répondre à notre objectif de recherche, soit de caractériser les mécanismes de régulation de *HNF4α* sur la production CXCL1 par les cellules épithéliales intestinales, il fallait d'abord s'assurer que l'expression de CXCL1 modulée par la perte de *HNF4α* était due à une production accrue par les cellules épithéliales intestinales et non due à une production par les cellules immunitaires recrutées au site d'inflammation. Nous avons donc utilisé différentes lignées de cellules épithéliales dans lesquels nous avons surexprimé le facteur *HNF4α* ou réprimé son expression par shARN (figure 9). Nous avons confirmé par des tests ELISA, que la perte de *HNF4α* dans les cellules épithéliales intestinales entraînait une augmentation de la relâche de CXCL1 par ces mêmes cellules (figure 10C). Inversement, nous avons démontré que la surexpression de *HNF4α* modulait à la baisse l'expression de KC/CXCL1 par les cellules épithéliales intestinales (figure 10A et B). Nous avons également confirmé, par PCR quantitatif en comparant les niveaux du transcrit de CXCL1 dans les cellules exprimant ou non *HNF4α*, que la modulation de l'expression de CXCL1 par *HNF4α* se faisait au niveau transcriptionnel. En effet, les niveaux du transcrit de CXCL1 étaient diminués dans les cellules épithéliales intestinales où le facteur *HNF4α* est surexprimé (figure 11A) tandis que la diminution de l'expression de *HNF4α* amène une augmentation de l'ARNm de CXCL1 dans les cellules Caco-2/sh*HNF4α* (figure 11B).

En ce qui concerne la littérature, il est connu que la régulation de la transcription du gène *CXCL1* est assurée par le facteur de transcription NFκB (Nirodi *et al.*, 2001). En effet, la dégradation des IκB en réponse à un stress, tel une stimulation à l'interleukine-1, permet au complexe formé par les sous-unités p50 et p65 de NFκB d'être activé et de transloquer au noyau pour lier le promoteur de *CXCL1* et ainsi activer la transcription de ce gène. Étant donné que nous avons montré que la modulation de l'expression de *CXCL1* par HNF4α se fait au niveau transcriptionnel, nous avons évalué la capacité de HNF4α à moduler l'effet stimulateur de NFκB sur la transcription de *CXCL1*. Nous avons montré, par des essais luciférase en co-transfectant les deux facteurs de transcription avec le promoteur de *CXCL1* en amont du gène de la luciférase, que HNF4α a la capacité de réduire d'environ 30% l'activation du gène de la luciférase assurée la sous-unité p65 du facteur NFκB (figure 12).

Bien que HNF4α puisse réduire l'activation du promoteur de *CXCL1* assurée par le facteur NFκB, tel que le montrent nos essais luciférase, HNF4α n'agit pas comme répresseur de la transcription directement au niveau du promoteur de *CXCL1*. Nous avons invalidé notre hypothèse selon laquelle HNF4α pourrait réprimer la transcription assurée par NFκB par un mécanisme de compétition pour le site de liaison à l'ADN. En effet, bien que nous ayons identifié des sites potentiels de liaison pour HNF4α au niveau du promoteur de *CXCL1*, ce dernier facteur n'a pas la capacité de lier ces sites, et ce, même en conditions de stress inflammatoire (figure 13). Par ailleurs, l'un des sites identifiés est en fait lié par la poly ADP-ribose polymérase-1 (PARP-1) (Nirodi *et al.*, 2001). Cependant, la diminution de l'expression de HNF4α

par l'utilisation de shARN, ne semble pas moduler l'expression de PARP-1 ni sa liaison à l'ADN (résultats non présentés). Ainsi, la liaison de HNF4 α au promoteur de *CXCL1* n'est pas impliquée dans la modulation de l'expression de cette chimiokine en conditions inflammatoires. Également, nous n'avons pas été en mesure de détecter la présence de NF κ B lors d'essais d'immunoprécipitation avec le facteur HNF4 α suggérant que la régulation de NF κ B par le facteur HNF4 α n'implique pas une interaction directe entre ces deux facteurs.

Toutefois, la surexpression de HNF4 α au niveau des cellules HT29 affecte directement l'activation de NF κ B-p65. En effet, la translocation nucléaire de NF κ B-p65 en réponse à des conditions de stress inflammatoire est diminuée par la surexpression de HNF4 α dans les cellules HT29 (figure 15), et ce, sans doute en raison d'une diminution de la dégradation de I κ B α (résultats non présentés). Inversement, nous avons observé que la diminution de l'expression de HNF4 α dans les cellules Caco-2/shHNF4 α amène une augmentation de l'activité de NF κ B (figure 16A) attribuable à une augmentation de la dégradation de I κ B α (figure 17), concordant avec les résultats observés *in vivo* lors de la perte de HNF4 α au niveau de l'épithélium colique de souris (Darsigny *et al.*, 2009). Également, la liaison de NF κ B-p65 à l'ADN est augmentée lorsque l'expression du facteur de transcription HNF4 α est diminuée, démontrant encore une fois que la perte de HNF4 α entraîne une augmentation de l'activation de NF κ B en réponse à des conditions inflammatoires. Il reste néanmoins à déterminer les mécanismes par lesquels HNF4 α stabilise l'expression de I κ B α et ainsi bloque l'activation de NF κ B, menant à une diminution de l'expression de *CXCL1*. Nous avons envisagé la possible implication de la voie de

STAT3 dans cette régulation, puisque ce facteur de transcription est généralement associé à une réponse anti-inflammatoire (Matsukawa *et al.*, 2005, Murray, 2006). De plus, la participation de STAT3 dans la production de la chimiokine CXCL1 et le recrutement de neutrophiles a été démontrée (Fielding *et al.*, 2008). En effet, l'hyperactivation de STAT3 résultant de la mutation du récepteur à l'IL-6 chez la souris, réduit la production de KC/CXCL1 et l'infiltration de neutrophiles suite à l'induction d'une péritonite. Inversement, la délétion de STAT3 entraîne la production accrue de KC/CXCL1 en réponse à l'induction de la péritonite (Fielding *et al.*, 2008). Nous avons évalué l'activation de STAT3 au niveau de notre modèle cellulaire de surexpression de HNF4 α et il s'avère que les cellules IEC-6/Cdx2-HNF4 α montrent une phosphorylation activatrice de STAT3 plus élevée comparativement aux cellules IEC-6/RV (figure 19). Bien que pour cette expérience, nous n'avons pu comparer les niveaux de phosphorylation de STAT3 dans les cellules IEC-6/Cdx2-HNF4 α avec les niveaux d'expression dans les cellules IEC-6/Cdx2, nous avons tout de même confirmé par immunobuvardage que l'augmentation de la phosphorylation de STAT3 était attribuable à la surexpression de HNF4 α et non à la surexpression du facteur Cdx2 (résultats non présentés). L'hyperactivation de STAT3 dans les cellules surexprimant le facteur de transcription HNF4 α demeure une piste intéressante pour expliquer la modulation de l'expression de KC/CXCL1 par le facteur HNF4 α . D'autant plus que certains groupes de recherches ont proposé que STAT3 ainsi que l'IL-10, interleukine qui en se liant à son récepteur va activer STAT3, avaient la capacité d'inhiber l'activité transcriptionnelle de NF κ B (Yu et Kone, 2004, Kortylewski *et al.*, 2009, Schottelius *et al.*, 1999, Nachtwey et Spencer, 2008).

Toutefois, dans notre cas, le lien entre ces différentes voies de signalisation n'est toujours pas démontré. Dans le même ordre d'idées, certaines études ont montré l'inhibition de l'activité de NFκB par l'interleukine-4 via le facteur de transcription STAT6 (Yu *et al.*, 2009; Abu-Amer, 2001). Or, il s'avère que le modèle de délétion de HNF4α au niveau de l'épithélium colique de souris montre une diminution de l'expression de la molécule anti-inflammatoire IL-4 (tableau 5). Toutefois, la diminution de IL-4 au niveau des tissus coliques invalidés ne s'avère pas être significative tel que quantifiée par micropuce d'anticorps. Il serait donc pertinent de comparer la production de IL-4 dans les modèles cellulaires surexprimant ou non HNF4α.

L'effet régulateur de HNF4α sur l'activité de NFκB pourrait également impliquer la participation des protéines phosphatases. Il a été démontré que les protéines phosphatases 1 et 2A (PP1 et PP2A) régulent négativement la voie canonique de NFκB en déphosphorylant leurs substrats, les kinases IKK (Mitsuhashi *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2008, Witt *et al.*, 2009). Également, l'étude de Feng et ses collaborateurs a démontré que le traitement de cellules épidermiques de souris avec l'acide okadaïque entraînait l'activation de NFκB et la production de KC/CXCL1 dues à l'inhibition de PP1 et PP2A (Feng *et al.*, 2005). L'acide okadaïque est en fait un inhibiteur de protéines phosphatases, lequel lie PP1 et PP2A et agit comme inhibiteur non-compétitif. En conséquence, l'acide okadaïque mène à l'hyperphosphorylation des plusieurs molécules, dont notamment les kinases IKK (Feng *et al.*, 2005). Or, il s'avère que la protéine inhibitrice de PP1 (KEPI) est significativement augmentée dans les tissus coliques du modèle de délétion de HNF4α

généralisé par Darsigny (Darsigny *et al.*, 2009) (résultats non présentés). KEPI est en fait un inhibiteur de la protéine phosphatase 1, lequel empêche PP1 de déphosphoryler ces substrats dont le complexe IKK. L'augmentation de cet inhibiteur au niveau des tissus coliques de souris invalidées pourrait expliquer l'augmentation de l'activité de NFκB dans ces tissus (Darsigny *et al.*, 2009), découlant d'une augmentation de l'activité des kinases IKK et donc d'une augmentation de la phosphorylation des IκB. L'étude de ces phosphatases s'avérerait donc pertinente afin d'expliquer l'effet régulateur de HNF4α sur l'activité de NFκB.

V-Conclusions et Perspectives

Dans cette étude, nous avons pour but de démontrer une nouvelle implication de HNF4 α dans la réponse inflammatoire. Ce rôle devait se manifester par la régulation négative de l'expression de CXCL1 par le facteur de transcription au niveau des cellules épithéliales intestinales. La chimiokine CXCL1 est fortement impliquée dans la réponse inflammatoire en étant l'une des chimiokines les plus importantes dans le recrutement des neutrophiles et de diverses autres cellules immunitaires.

Nos résultats témoignent tout d'abord de l'activation du facteur HNF4 α en réponse aux conditions de stress pro-inflammatoire, mimé par le peroxyde d'hydrogène et l'interleukine-1 β . En effet, nous avons montré que la capacité de liaison à l'ADN de HNF4 α était augmentée dans ces conditions de stress inflammatoire. De plus, nous avons montré qu'un traitement inflammatoire entraîne une augmentation des niveaux protéiques de HNF4 α , et ce, de manière dépendante de l'activation de la kinase de stress JNK. L'inhibition de l'activité de JNK empêche l'augmentation protéique de HNF4 α et entraînerait sans doute la dégradation de ce facteur. Toutefois, l'inhibition du protéasome ne parvient pas à rétablir les niveaux protéiques de HNF4 α observés suite à l'induction d'un stress inflammatoire.

Nous avons montré que la perte de HNF4 α au niveau de l'épithélium colique de souris entraîne une production accrue de plusieurs facteurs pro-inflammatoires au niveau des tissus coliques, dont la chimiokine CXCL1. Grâce à la génération de modèles de cellules épithéliales intestinales (CEI) surexprimant HNF4 α , nous avons

montré que la présence de HNF4 α affecte directement la production de la chimiokine, puisque la surexpression de HNF4 α amène une diminution de l'expression et de la sécrétion de CXCL1 par les CEI. La régulation de l'expression de cette chimiokine par HNF4 α se fait au niveau transcriptionnelle, puisque la surexpression du facteur de transcription amène une diminution de l'expression du transcrit de CXCL1. Au niveau de la littérature, il est rapporté que la régulation transcriptionnelle de CXCL1 est assurée principalement par le facteur de transcription NF κ B. Nous avons montré pour la première fois, que le facteur HNF4 α a la capacité de réduire l'effet de NF κ B sur l'activation du promoteur de *CXCL1*, lorsqu'il est co-transfecté avec le facteur NF κ B dans les CEI. L'effet régulateur de HNF4 α sur NF κ B se fait au niveau de l'activation de ce dernier. En effet, la surexpression de HNF4 α au niveau des cellules épithéliales intestinales entraîne une diminution de la phosphorylation activatrice de NF κ B-p65, de la translocation nucléaire et de la capacité de liaison à l'ADN de ce facteur. Nous avons également montré que la perte de HNF4 α amène la suractivation NF κ B-p65 via l'augmentation de la dégradation de I κ B α , tel que montré au niveau des cellules épithéliales où l'expression de HNF4 α est réprimée. Ce résultat s'accorde avec l'observation rapportée dans l'étude de Darsigny et ses collaborateurs, où la phosphorylation de I κ B α était augmentée au niveau des tissus coliques de souris invalidées pour le gène *HNF4 α* , suggérant une augmentation de l'activation de NF κ B suite à la perte de HNF4 α . Nous avons ouvert une piste pouvant concilier l'augmentation de l'expression de HNF4 α avec la baisse de l'activation de NF κ B, en montrant que la surexpression de HNF4 α au niveau des cellules IEC-6 entraîne une hyperactivation de STAT3. Tous ces résultats mis en perspectives soutiennent le rôle

protecteur de HNF4 α au niveau des cellules épithéliales intestinales face à un stress pro-inflammatoire.

Toutefois, il reste à déterminer les mécanismes par lesquels HNF4 α stabilise l'expression de I κ B α et ainsi permet une séquestration accrue de NF κ B et une diminution de l'expression de CXCL1. De nouvelles avenues seraient pertinentes à explorer afin d'élucider le mécanisme complet de régulation de HNF4 α sur l'activité de NF κ B. Il faudrait d'abord évaluer l'importance de l'activation de STAT3 dans la production de la chimiokine CXCL1 au niveau des cellules épithéliales intestinales. Il serait également intéressant de déterminer l'élément responsable de l'hyperactivation de STAT3 au niveau des lignées de cellules épithéliales surexprimant le facteur HNF4 α , et du même coup déterminer le rôle de HNF4 α dans la régulation de ce facteur. Aussi, il serait pertinent d'évaluer les niveaux d'expression des phosphatases PP1 et PP2A dans les différentes lignées de cellules épithéliales intestinales surexprimant ou non le facteur HNF4 α , et de déterminer si le facteur de transcription HNF4 α régule l'expression de ces deux phosphatases, lesquelles sont connues pour réguler négativement la voie de canonique de NF κ B. Étant donné que la quantification de l'expression des gènes au niveau de l'épithélium colique de souris invalidées pour HNF4 α , à l'aide d'une micropuce d'ADN, a révélé la modulation de la protéine inhibitrice de PP1, il serait tout à fait justifié d'évaluer l'impact direct du facteur HNF4 α sur l'expression de cette protéine.

VI-Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Fernand-Pierre Gendron, avec qui je me suis tout de suite bien entendu. Je voudrais le remercier pour sa présence et son dévouement envers chaque membre du laboratoire. Grâce à son attitude, nous avons formé une équipe soudée où l'entraide et la bonne entente ont toujours régnées. Je salue également sa présence, sa générosité et le réconfort dont il a fait preuve. Il a toujours su m'encourager, me valoriser et m'accompagner dans les obstacles de la recherche. Je souhaite également le remercier de m'avoir donné une si grande liberté sur ce projet, les compétences que j'ai acquises grâce cette latitude vont me servir dans mes prochains projets de carrière et de vie.

J'aimerais également remercier mes collègues Christine, Émilie, Djordje et Karine. Ces personnes n'ont pas seulement été des collègues de travail au cours de ma maîtrise, ils ont été de véritables amis sur qui j'ai toujours pu compter. Les folies, les taquineries et les discussions scientifiques ont participé à la réussite de ma maîtrise. J'ai passé trois merveilleuses années en leur compagnie. Je salue également Isabelle et Maude, deux stagiaires très énergiques qui ont agrémenté la vie dans le laboratoire.

Un merci tout spécial à mes parents qui m'ont encouragée à toujours aller plus loin et à donner le meilleur de moi-même. Je remercie également mes trois sœurs qui m'ont fait vivre et me feront encore vivre toutes sortes d'émotions, mais qui seront toujours être là pour moi. Je salue également mon amoureux Philippe, un homme extraordinaire, qui m'a grandement encouragé dans les derniers milles de ce projet.

J'aimerais également remercier le Pr François Boudreau ainsi que son étudiant Mathieu Darsigny pour leur soutien et leur aide dans l'accomplissement de ce projet. Je remercie aussi les professeurs ayant participé à ma formation ainsi que tous les membres du département. Finalement, je souhaite remercier le Pr Guillaume Grenier ainsi que le Pr Abdelaziz Amrani pour avoir révisé cet ouvrage.

VII-Bibliographie

Abu-Amer, Y. IL-4 abrogates osteoclastogenesis through STAT6-dependent inhibition of NF-kappaB. *J. Clin. Invest.* 107 (11) : 1375-85, 2001.

Ahn, S. H., Shah, Y. M., Inoue, J., Morimura, K., Kim, I., Yim, S., Lambert, G., Kurotani, R., Nagashima, K., Gonzalez, F. J., Inoue, Y. Hepatocyte nuclear factor 4alpha in the intestinal epithelial cells protects against inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 14 (7) : 908-20, 2008.

Al-Ashy, R., Chakroun, I., El-Sabban, M. E., Homaidan, F. R. The role of NF-kappaB in mediating the anti-inflammatory effects of IL-10 in intestinal epithelial cells. *Cytokine.* 36 (1-2) : 1-8, 2006.

Amiri, K. I., Ha H. C., Smulson M. E., Richmond A. Differential regulation of CXC ligand 1 transcription in melanoma cell lines by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Oncogene.* (59) : 7714-22, 2006.

Baumgart, D. C., Carding, S. R. Inflammatory bowel disease : cause and immunobiology. *Lancet.* 369 (9573) : 1627-40, 2007.

Chen, W. S., Manova, K., Weinstein, D. C., Duncan, S. A., Plump, A. S., Prezioso, V. R., Bachvarova, R. F., Darnell, J. E. Jr. Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev.* 8 (20) : 2466-77, 1994.

Costa, R. H., Grayson, D. R., Darnell, J. E. Jr. Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Mol. Cell. Biol.* 9 (4) : 1415-25, 1989.

Darsigny, M., Babeu, J. P., Dupuis, A. A., Furth, E. E., Seidman, E. G., Lévy, E., Verdu, E. F., Gendron, F. P., Boudreau, F. Loss of hepatocyte-nuclear-factor-4alpha affects colonic ion transport and causes chronic inflammation resembling inflammatory bowel disease in mice. *PLoS One.* 4 (10) : e7609, 2009.

Duda, K., Chi, Y. I., Shoelson, S. E. Structural basis for HNF-4alpha activation by ligand and coactivator binding. *J. Biol. Chem.* 279 (22) : 23311-6, 2004.

Duncan, S. A., Nagy, A., Chan, W. Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos. *Development.* 124 (2) : 279-87, 1997.

Eeckhoute, J., Moerman, E., Bouckennooghe, T., Lukoviak, B., Pattou, F., Formstecher, P., Kerr-Conte, J., Vandewalle, B., Laine, B. Hepatocyte nuclear

factor 4 alpha isoforms originated from the P1 promoter are expressed in human pancreatic beta-cells and exhibit stronger transcriptional potentials than P2 promoter-driven isoforms. *Endocrinology*. 144 (5) : 1686-94, 2003.

Esworthy, R. S., Aranda, R., Martín, M. G., Doroshov, J. H., Binder, S. W., Chu, F. F. Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 281 (3) : G848-55, 2001.

Feng, G., Ohmori, Y., Chang, P. L. Production of chemokine CXCL1/KC by okadaic acid through the nuclear factor-kappaB pathway. *Carcinogenesis*. 27 (1) : 43-52, 2006.

Festen, E. A., Szperl, A. M., Weersma, R. K., Wijimenga, C., Wappenaar, M. C. Inflammatory bowel disease and celiac disease : overlaps in the pathology and genetics, and their potential drug targets. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*. 9 (2) : 199-218, 2009.

Fielding, C. A., McLoughlin, R. M., McLeod, L., Colmont, C. S., Najdovska, M., Grail, D., Ernst, M., Jones, S. A., Topley, N., Jenkins, B. J. IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. *J. Immunol*. 181 (3) : 2189-95, 2008.

Garrison, W. D., Battle, M. A., Yang, C., Kaestner, K. H., Sladek, F. M., Duncan, S. A. Hepatocyte nuclear factor 4alpha is essential for embryonic development of the mouse colon. *Gastroenterology*. 130 (4) : 1207-20, 2006.

Gartner, L., Hiatt, J. L. Atlas en couleur d'Histologie. p.258-259. Éditions Pradel, 2^e édition française, Paris, 1997.

Grbić, D. M., Degagné, É., Langlois, C., Dupuis, A. A., Gendron, F. P. Intestinal inflammation increases the expression of P2Y6 receptor on epithelial cells and the release of CXCL8 by UDP. *J. Immunol*. 180 (4) : 2659-68, 2008.

Guo, H., Gao, C., Mi, Z., Zhang, J., Kuo, P. C. Characterization of the PC4 binding domain and its interactions with HNF4alpha. *J. Biochem*. 141(5):635-40, 2007.

Hadzopoulou-Cladaras, M., Kistanova, E., Evagelopoulou, C., Zeng, S., Cladaras, C., Ladias, J. A. Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *J. Biol. Chem*. 272 (1) : 539-50, 1997.

Hatzis, P., Talianidis, I. Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4alpha gene expression. *Mol. Cell. Biol*. (21) : 7320-30, 2001.

Hatzis, P., Kymizi, I., Talianidis, I. Mitogen-activated protein kinase-mediated disruption of enhancer-promoter communication inhibits hepatocyte nuclear factor 4alpha expression. *Mol. Cell. Biol.* (19) : 7017-29, 2006.

Hayhurst, G. P., Lee, Y. H., Lambert, G., Ward, J. M., Gonzalez, F. J. Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* 21 (4) : 1393-403, 2001.

Hertz, R., Magenheimer, J., Berman, I., Bar-Tana, J. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature.* 392 (6675) : 512-61998, 1998.

Hong, Y. H., Varanasi, U. S., Yang, W., Leff, T. AMP-activated protein kinase regulates HNF4alpha transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability. *J. Biol. Chem.* 278 (30) : 27495-501, 2003.

Iordanidou, P., Aggelidou, E., Demetriades, C., Hadzopoulou-Cladaras, M. Distinct amino acid residues may be involved in coactivator and ligand interactions in hepatocyte nuclear factor-4alpha. *J. Biol. Chem.* 280 (23) : 21810-9, 2005.

Jumarie, C., Malo, C. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J. Cell. Physiol.* 149 (1) : 24-33, 1991.

Karam, S. M. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci.* 15 (4) : D286-D298, 1999.

Kelsall, B. L. Innate and adaptive mechanisms to control of pathological intestinal inflammation. *J. Pathol.* 214 (2) : 242-59, 2008.

Kortylewski, M., Xin, H., Kujawski, M., Lee, H., Liu, Y., Harris, T., Drake, C., Pardoll, D., Yu, H. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signalling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 15 (2) : 114-23, 2009.

Laing, K. J., Secombes, C. J. Chemokines. *Dev. Comp. Immunol.* 28 (5) : 443-60, 2004.

Lazarevich, N., Cheremnova, O. A., Varga, E. V., Ovchinnikov, D. A., Kudrjavitseva, E. I., Morozova, O. V., Fleishman, D. I., Engelhardt, N. V., Duncan, S. A. Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors. *Hepatology.* 39 (4) : 1038-47. 2004.

Leclerc I, Lenzner C, Gourdon L, Vaulont S, Kahn A, Viollet B. Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase. *Diabetes.* 50 (7) : 1515-21, 2001.

Li, H. Y., Liu, H., Wang, C. H., Zhang, J. Y., Man, J. H., Gao, Y. F., Zhang, P. J., Li, W. H., Zhao, J., Pan, X., Zhou, T., Gong, W. L., Li, A. L., Zhang, X. M.

Deactivation of the kinase IKK by CUEDC2 through recruitment of the phosphatase PP1. *Nat. Immunol.* 9 (5) : 533-41, 2008.

Li, J., Ning, G., Duncan, S. A. Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev.* 14 (4) : 464-74, 2000.

Louet, J. F., Hayhurst, G., Gonzalez, F. J., Girard, J., Decaux, J. F. The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB). *J. Biol. Chem.* 277 (41) : 37991-8000, 2002.

Lussier, C. R., Babeu, J. P., Auclair, B. A., Perreault, N., Boudreau, F. Hepatocyte nuclear factor-4alpha promotes differentiation of intestinal epithelial cells in a coculture system. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294 (2) : G418-28, 2008.

MacDonald, T. T., Monteleone, G. Immunity, inflammation and allergy in the gut. *Science.* 307 (5717) : 1920-5, 2005.

Maeda, Y., Seidel, S. D., Wei, G., Liu, X., Sladek, F. M. Repression of hepatocyte nuclear factor 4alpha tumor suppressor p53: involvement of the ligand-binding domain and histone deacetylase activity. *Mol. Endocrinol.* 16 (2) : 402-10, 2002.

Matsukawa, A., Kudo, S., Maeda, T., Numata, K., Watanabe, H., Takeda, K., Akira, S., Ito, T. Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *J. Immunol.* 175 (5) : 3354-9, 2005.

Mitsubishi, S., Shima, H., Li, Y., Tanuma, N., Okamoto, T., Kikuchi, K., Ubukata, M. Tautomycin suppresses the TNF α /NF- κ B pathway via inhibition of IKK activation. *Int. J. Oncol.* 33 (5) : 1027-35, 2008.

Muller, C. A., Autenrieth, I. B., Peschel, A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (12) : 1297-1307, 2005.

Murray, P. J. STAT3-mediated anti-inflammatory signalling. *Biochem. Soc. Trans.* 34 (Pt 6) : 1028-31, 2006.

Nachtwey, J., Spencer, J. V. HCMV IL-10 suppresses cytokine expression in monocytes through inhibition of nuclear factor- κ B. *Viral Immunol.* 21 (4) : 477-82, 2008.

Nakhei, H., Lingott, A., Lemm, I., Ryffel, G. U. An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNF4 α predominates in undifferentiated murine cell types. *Nucleic Acids Res.* 26 (2) : 497-504, 1998.

Nieto, N., Torres, M. I., Fernández, M. I., Girón, M.D., Ríos, A., Suárez, M.D., Gil, A. Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. *Dig. Dis. Sci.* 45 (9) : 1820-27, 2002.

Nirodi, C., Hart, J., Dhawan, P., Moon, N., Nepveu, A., Richmond, A. The role of CDP in the negative regulation of *CXCL1* gene expression. *J. Biol. Chem.* 276 (28) : 26122-31, 2001.

Olsen, L., Bressendorff, S., Troelsen, J. T., Olsen, J. Differentiation-dependent activation of the human intestinal alkaline phosphatase promoter by HNF-4 in intestinal cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289 (2) : G220-6, 2005.

Parviz, F., Matullo, C., Garrison, W. D., Savatski, L., Adamson, J. W., Ning, G., Kaestner, K. H., Rossi, J. M., Zaret, K. S., Duncan, S. A. Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat. Genet.* 34 (3) : 292-6, 2003.

Petrescu, A. D., Hertz, R., Bar-Tana, J., Schroeder, F., Kier, A. B. Ligand specificity and conformational dependence of the hepatic nuclear factor-4alpha (HNF-4alpha). *J. Biol. Chem.* 276 (40) : 36970-82, 2002.

Qu, X., Lam, E., Doughman, Y. Q., Chen, Y., Chou, Y. T., Lam, M., Turakhia, M., Dunwoodie, S. L., Watanabe, M., Xu, B., Duncan, S. A., Yang, Y. C. Cited2, a

coactivator of HNF4alpha, is essential for liver development. EMBO J. 26 (21) : 4445-56, 2007.

Radema, S. A., van Deventer, S. J., Cerami, A. Interleukin-1 beta is expressed predominantly by enterocytes in experimental colitis. Gastroenterology. 100 (5 Pt 1) : 1180-86, 1991.

Rezaie, A., Parker, R. D., Abdollahi, M. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease : An epiphenomenon or the cause? Dig. Dis. Sci. 52 (9) : 2015-21, 2007.

Ruse, M. D. Jr., Privalsky, M. L., Sladek, F. M. Competitive cofactor recruitment by orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1: modulation by the F domain. Mol. Cell. Biol. 22 (6) : 1626-38, 2002.

Ryffel, G. U. Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. J. Mol. Endocrinol. 27(1) : 11-29, 2001

Sandborn, W. Kirsner's Inflammatory bowel diseases. Philadelphia, 2004.

Schottelius, A. J., Mayo, M. W., Sartor, R. B., Baldwin, A. S. Jr. Interleukin-10 signalling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. J. Biol. Chem. 274 (45) : 31868-74, 1999.

Sladek, F. M., Zhong, W. M., Lai, E., Darnell, J. E. Jr. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev.* 4 (12B) : 2353-65, 1990.

Soutoglou, E., Katrakili, N., Talianidis, I. Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol. Cell.* 5 (4) : 745-51, 2000.

Stadnyk, A. W. Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can. J. Gastroenterol.* 16 (4) : 241-6, 2002.

Stadnyk, A. W., Kearsy, J. A. Pattern of proinflammatory cytokine mRNA expression during *Trichinella spiralis* infection of the rat. *Infect. Immun.* 64 : 5138-43, 1996.

Stegmann, A., Hansen, M., Wang, Y., Larsen, J. B., Lund, L. R., Ritié, L., Nicholson, J. K., Quistorff, B., Simon-Assmann, P., Troelsen, J. T., Olsen, J. Metabolome, transcriptome, and bioinformatic cis-element analyses point to HNF-4 as a central regulator of gene expression during enterocyte differentiation. *Physiol. Genomics.* 27 (2) : 141-55, 2006.

Sun, K., Montana, V., Chellappa, K., Brelivet, Y., Moras, D., Maeda, Y., Parpura, V., Paschal, B. M., Sladek, F. M. Phosphorylation of a conserved serine in

the deoxyribonucleic acid binding domain of nuclear receptors alters intracellular localization. *Mol. Endocrinol.* 21 (6) : 1297-311, 2007.

Tham, D. M., Whitin, J. C., Cohen, H. J. Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis. *Pediatr. Res.* 51 (5) : 641-46, 2002.

Torres-Padilla, M. E., Fougère-Deschatrette, C., Weiss, M. C. Expression of HNF4 α isoforms in mouse liver development is regulated by sequential promoter usage and constitutive 3' end splicing. *Mech. Dev.* 109(2):183-93, 2001.

Torres-Padilla, M. E., Sladek, F. M., Weiss, M. C. Developmentally regulated N-terminal variants of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 α mediate multiple interactions through coactivator and corepressor-histone deacetylase complexes. *J. Biol. Chem.* 277 (47) : 44677-87, 2002.

Wang, D., Wang, H., Brown, J., Daikoku, T., Ning, W., Shi, Q., Richmond, A., Strieter, R., Dey, S. K., DuBois, R. N. CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer. *J. Exp. Med.* 203(4):941-51, 2006.

Wisely, G. B., Miller, A. B., Davis, R. G., Thornquest, A. D. Jr., Johnson, R., Spitzer, T., Sefler, A., Shearer, B., Moore, J. T., Miller, A. B., Willson, T. M., Williams, S. P. Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids. *Structure.* 10 (9) : 1225-34, 2002.

Witt, J., Barisic, S., Schumann, E., Allgöwer, F., Sawodny, O., Sauter, T., Kulms, D. Mechanism of PP2A-mediated IKK beta dephosphorylation: a systems biological approach. *BMC. Syst. Biol.* 3 : 71, 2009.

Xu, Z., Tavares-Sanchez, O. L., Li, Q., Fernando, J., Rodriguez, C. M., Studer, E. J., Pandak, W. M., Hylemon, P. B., Gil, G. Activation of bile acid biosynthesis by the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK): hepatocyte nuclear factor-4alpha phosphorylation by the p38 MAPK is required for cholesterol 7alpha-hydroxylase expression. *J. Biol. Chem.* 282 (34) : 24607-14, 2007.

Yu, Z., Kone, B. C. The STAT3 DNA-binding domain mediates interaction with NF-kappaB p65 and inducible nitric oxide synthase transrepression in mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15 (3) : 585-91, 2004.

Yu, M., Moreno, J. L., Stains, J. P., Keegan, A. D. Complex regulation of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) expression by interleukin 4 (IL-4): IL-4 indirectly suppresses receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)-mediated TRAP expression but modestly induces its expression directly. *J. Biol. Chem.* 284 (47) : 32968-79, 2009.